



Etude de la dynamique conformationnelle de FhaC, le transporteur membranaire de l'hémagglutinine filamenteuse de *Bordetella pertussis*

Jeremy Guerin

► To cite this version:

Jeremy Guerin. Etude de la dynamique conformationnelle de FhaC, le transporteur membranaire de l'hémagglutinine filamenteuse de *Bordetella pertussis*. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2014. Français. <NNT : 2014LIL2S032>. <tel-01207400>

HAL Id: tel-01207400

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01207400>

Submitted on 30 Sep 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT

présentée et soutenue publiquement
par

Guérin JérémY

le 30 septembre 2014

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES

de l'Université de Lille 2 (Droit et Santé)

**Etude de la dynamique conformationnelle
de FhaC, le transporteur membranaire de
l'hémagglutinine filamenteuse de
*Bordetella pertussis***

Composition du Jury

Dr Jean-Marie LACROIX

Président

Dr Valérie BELLE

Rapporteur

Dr Eric CASCALES

Rapporteur

Dr André MATAGNE

Examineur

Dr Françoise JACOB-DUBUISSON

Directeur de thèse

Dr Hervé VEZIN

Directeur de thèse

Remerciements

J'adresse mes remerciements à Camille Locht pour m'avoir hébergé dans son laboratoire durant toutes ces années, pour ses conseils, et pour m'avoir permis de m'épanouir au sein de son équipe Franco-Belge.

Un très très très grand Merci à Françoise Jacob-Dubuisson. Tu as été une super directrice de thèse ! Merci pour ton encadrement au quotidien et tout ce que tu m'as appris durant ces nombreuses années. L'énergie et l'enthousiasme que tu mets dans ton travail ont été/et seront toujours pour moi, un exemple à suivre. Je tiens à te remercier aussi pour la patience dont tu as fait preuve pour corriger mes fautes d'orthographe et de syntaxes anglaises comme françaises !

Un grand Merci aussi à Hervé Vezin, mon co-directeur de thèse RPEiste ! Même si je sais qu'il me faudra encore plusieurs années afin de comprendre toute la subtilité de la RPE, Merci à toi de m'avoir initié ! Merci aussi d'avoir toujours trouvé du temps, et parfois même le weekend, pour la RPE impulsioneille ! J'ai, d'ailleurs, une petite pensée pour toutes ces centaines de litres d'hélium que nous avons sacrifiées pour notre protéine membranaire préférée ! J'en profite aussi pour remercier Nadia et Karima pour leur sympathie et leur précieuse aide avec le spectro C.W de RPE.

Bien que redondant, je tiens sincèrement à vous remercier ensemble, Françoise et Hervé. J'ai adoré travailler à vos côtés, et je me suis réellement épanoui intellectuellement avec un tel sujet ! Vous m'avez permis de découvrir ce qu'était le monde de la biophysique, et c'est donc en partie grâce à vous que j'envisage actuellement de poursuivre dans cette discipline.

Merci également à Isabelle Landrieu et Valérie Belle qui ont été membres du comité de suivi de thèse. Vos suggestions et vos conseils m'ont été très importants et m'ont permis de mieux appréhender mon sujet. Merci pour votre disponibilité et votre enthousiasme lors de nos réunions !

Enfin je remercie très chaleureusement tous les membres de l'équipe BRIPT que j'ai eu la chance de côtoyer durant toutes ces années. Merci pour la bonne ambiance qui règne, c'est un climat idéal pour travailler ! Et je tiens aussi à remercier plus particulièrement :

Sophie, car je crois que tu as bien mérité au moins une ligne de remerciement dans ma thèse ! Donc Merci énormément pour tout ce que tu m'as apporté, que ce soit l'aide professionnelle ou personnelle. C'était un réel plaisir, de t'accompagner pour ces longues randonnées jusqu'à la machine à café en dégustant les délicieux gâteaux que tu préparais ! Et... Merci aussi pour les 3-4 gels d'acrylamides que tu m'as coulé ;) !!

Elian, on a fait un bon bout de route ensemble au final ! Merci pour toutes les bonnes discussions que l'on a eu, parfois (souvent ?) accompagnées de quelques bières. C'était vraiment sympa de pouvoir échanger autant sur nos résultats de manips que sur nos hauts faits de gamers !

Elodie, même si tu n'as jamais voulu nettoyer ma paillasse ou faire mes solutions, tu as été une chouette voisine ! Ça été très sympa de pouvoir faire de la RPE avec toi, sur autre chose que FhaC, et surtout quand tu ramènes le petit déj ! Je te souhaite énormément de réussite pour la suite de ta thèse.

Anne Sophie, je te décerne l'éléphant d'or pour ta sympathie, ta gentillesse et ton dévouement sans faille lors des Kid Campus ! Merci de m'avoir sensibilisé à l'existence du « x-men power » !

Martin, Hey mec merci pour nos nombreux débats et de m'avoir appris le reste des couleurs de l'arc en ciel !

Domi, pour ta disponibilité et tes coups de main pour comprendre la logique du réseau informatique de l'IBL ! Pour te remercier le p'tit Tonio va t'apporter un cadeau dans le parking !

Manue, je n'ose même pas compter le nombre de mutations que nous avons fait sur FhaC ! En tout cas un grand merci pour ton aide !

Marco, merci pour tes (nombreux) e-mails qui ont été très divertissants !

Merci aussi à tous ceux qui ne font plus partie de l'équipe mais qui ont compté énormément durant ma thèse : Gégé, Nico, Eve, Hana et Pierre.

Je remercie également tous nos collaborateurs qui ont contribué à ce travail, Bernard Clantin et Vincent Villeret pour la partie cristallographie, Nathalie Saint pour les expériences d'électrophysiologie et Marc Lensink pour les différents modèles/simulations de FhaC. Merci à tous pour vos conseils et vos suggestions.

Merci à Nicolas Barois pour les expériences de microscopie électronique.

Enfin je tiens à remercier toutes les personnes qui ne sont pas liées professionnellement à ce travail de thèse, mais qui y ont grandement contribué par leur seule présence !

Charlotte pour avoir été ma bulle d'oxygène durant toutes mes (longues) années d'études ! Merci pour ton sourire et ta compréhension au quotidien.

C'est aussi grâce à toi que je referme aujourd'hui la dernière page de ma thèse, et c'est avec une immense joie que devant moi va s'ouvrir une nouvelle page de notre vie qui aura comme titre Arthur. Il ne nous reste plus qu'à l'écrire à deux, main dans la main. I.L.Y

Mes parents, Line et Jacky, pour leur soutien et de m'avoir permis de venir sur Lille afin d'y étudier la microbiologie.

Mes amis de Reims et de Lille, particulièrement à Cyril pour nos soirées sous le signe du Métal (lml), et Touf pour nos longues flâneries à pied ou...au clic ;).

Et je tiens aussi à remercier l'Institut Pasteur de Lille et la Région Nord-Pas-de-Calais pour leur financement au cours de mes 3 années de thèse.

Pour finir, je souhaite remercier tous les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail.

« Je vous le dis : il faut porter encore en soi un chaos, pour pouvoir mettre au monde une étoile dansante. »

Ainsi parlait Zarathoustra
Frédéric Nietzsche

Liste des abréviations

Å :	Ångström, unité de longueur = 10^{-10} mètres
BAM :	β Barrel Assembly Machinery
- BamA :	Transporteur du complexe BAM
C terminus :	Extrémité carboxy-terminale (d'une protéine)
Da :	Dalton, unité de masse atomique
δ :	Largeur de raie centrale (δ^{-1} inverse de cette largeur)
FHA :	Hémagglutinine Filamenteuse
- Fha30, Fha60, Fha80 :	dérivés de FHA de 30, 60 et 80 kDa, respectivement
FhaC :	Transporteur membranaire spécifique de la FHA
- Δ H1 :	Suppression génétique de l'hélice- α N-terminale
MTSL :	MethaneThioSulfonate Spin Label (sonde paramagnétique)
N terminus :	Extrémité amino-terminale (d'une protéine)
OMP :	Outer Membrane Protein (Protéine de membrane externe)
POTRA :	Polypeptide Transport Associated
RPE :	Résonance Paramagnétique Electronique
- CW :	Continuous wave (onde continue)
- DEER :	Double Electron-Electron Résonance (séquence utilisée en RPE en mode impulsionnel)
SDSL :	Site-Directed Spin Labelling (marquage de spin)
SUV :	Small Unilamellar Vesicle (vésicule unilamellaire de petite taille)
TPS :	Two-Partner Secretion (voie de sécrétion, ou domaine protéique)
T_c :	Temps de corrélation (τ_c)

Table des matières

INTRODUCTION	1
I. Biogenèse des OMPs	3
1. Translocation des OMPs à travers la membrane interne	3
a) Dans le cytoplasme : Sec B et Sec A	4
b) Membrane Interne : SecYEG	5
2. Intégration des OMPs dans la membrane externe	7
a) Dans le périplasme : les chaperonnes	7
b) Membrane externe : Le complexe Bam	9
II. Classification de la sécrétion de Type V	15
1. Autotransporteurs	15
a) T5a : « autotransporteurs classiques »	15
b) T5c : « autotransporteurs trimériques »	21
c) T5e : « autotransporteur inversé »	24
2. Systèmes TPS (et apparentés)	26
a) T5b : « sécrétion à 2 partenaires »	26
<i>TpsA (FHA)</i>	27
<i>TpsB (FhaC)</i>	30
b) T5dSS un mélange entre les systèmes autotransporteurs et TPS	38
III. Résonance Paramagnétique Electronique appliquée aux protéines	40
1. Marquage de spin (Site-Directed Spin Labeling)	40
2. De la propriété magnétique du MTSL jusqu'au spectre RPE	41
a) Principe physique	41
b) Un peu de calcul	42
c) Analyse de spectre RPE	45
3. Quelques exemples	48
4. La RPE en mode impulsionnel	50

OBJECTIFS	53
RESULTATS	56
1. Création des mutants et test fonctionnel	56
2. Premières expériences de RPE	57
3. Publication : <i>Conformational dynamics of protein transporter FhaC:</i> <i>large-scale motions of plug helix</i>	61
4. Rôle du Linker	101
a)Analyse de sa mobilité par RPE	101
b) Caractérisation de la fonction du linker pour la sécrétion	105
5. Rôle de L6	108
a) Analyse de sa mobilité par RPE.....	109
b) Test de sensibilité aux antibiotiques : R ₄₅₀ -D ₄₉₂	113
6. Autres changements conformationnels possibles ?	115
DISCUSSION ET PERSPECTIVE.....	119
BIBLIOGRAPHIE.....	125
Annexe 1 : Two-partner secretion : as simple as it sounds ?	132
Annexe 2 : Translocation path of substrate protein through Omp85 transporter ..	175
Annexe 3 : Simulations des spectres RPE.....	209

Introduction

Préambule

Au cours de ma thèse je me suis intéressé à la voie de sécrétion bactérienne de type 5b, que l'on nomme aussi voie TPS (Two-Partner Secretion). Ainsi je vous présenterai les membres de la voie de sécrétion de type 5 qui, nous le verrons dans la seconde partie de cette introduction, peuvent être classés en 5 catégories (T5a à T5e). Mais puisqu'ils partagent tous globalement la même voie de biogenèse, je vous propose donc dans un premier temps de voir les différentes étapes qui vont permettre à ces systèmes de sécrétion de se mettre en place dans la membrane externe des bactéries (Fig. 1). Nous verrons ainsi que cette insertion est régie par une protéine qui possède de grandes similarités avec les transporteurs retrouvés dans la voie TPS.

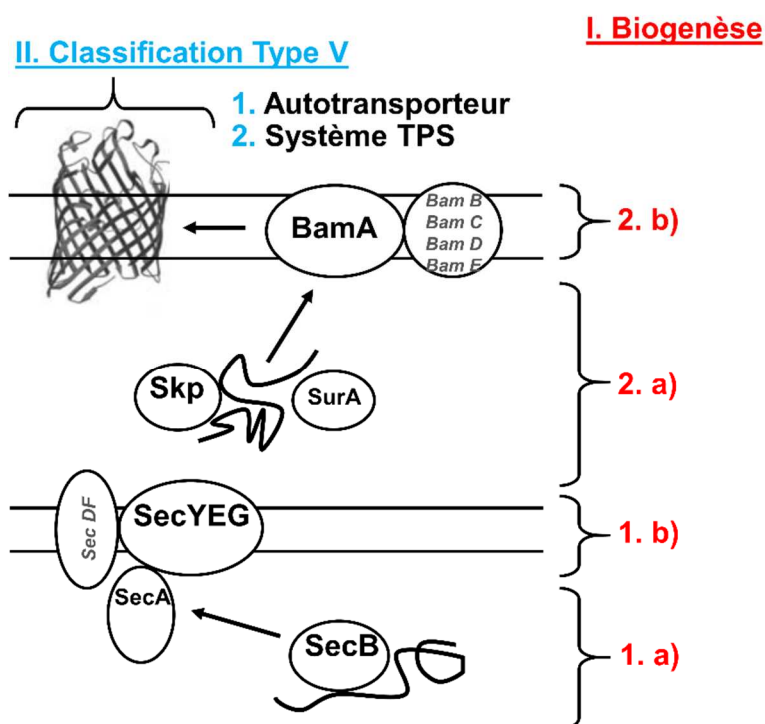


Figure 1 : Schéma récapitulatif des différentes parties de l'introduction (rouge et bleu). Les acteurs principaux de la biogenèse seront décrits, d'autres seront juste mentionnés (écritures noire et grise respectivement). Nous pouvons distinguer sur ce schéma le nom des protéines présentes dans 4 compartiments de la bactérie : le cytoplasme, la membrane interne, le périplasme et la membrane externe qui seront traités dans les chapitres correspondants (1.a, 1.b, 2.a, 2.b).

L'une des caractéristiques majeures des bactéries de type à Gram négatif vient de la présence d'une structure remarquablement organisée et nommée membrane externe. A la différence de la membrane interne, cette membrane est asymétrique. Son feuillet externe qui fait l'interface au milieu extérieur se compose d'une molécule lipidique nommée lipopolysaccharide (LPS). Son feuillet interne se rapproche plus en composition de la membrane interne, car formé principalement d'un phospholipide zwitterionique, la phosphatidyléthanolamine (PE, 90%) et de phosphatidylglycérol chargé négativement (PG, 10%) avec une faible proportion de cardiolipine (diPG) (Fig. 2).

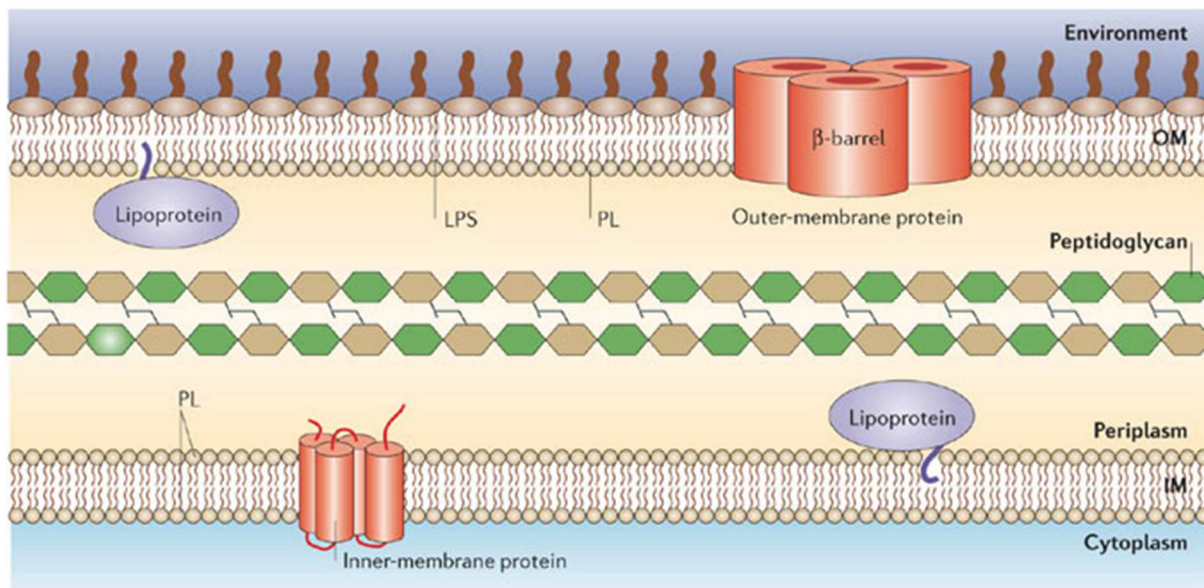


Figure 2 : Représentation de l'enveloppe d'une bactérie à Gram négatif (Silhavy et al., 2006). La membrane interne (IM) est composée d'une bicouche lipidique symétrique dans laquelle sont insérées des protéines possédant des domaines transmembranaires de type hélice α , tandis que la membrane externe (OM) est formée d'une bicouche asymétrique avec un feuillet interne de phospholipides (PL) et un feuillet externe composé de lipopolysaccharides (LPS). A l'instar de la membrane interne, des protéines sont aussi insérées dans cette membrane, toutefois elles possèdent une structure très particulière en tonneau β . Ces 2 membranes peuvent aussi servir à l'ancrage lipidique de lipoprotéines qui exercent leur fonction dans l'espace inter membranaire aqueux (périplasma) dans lequel se situe le peptidoglycane.

Cette membrane particulière possède un double rôle, l'un étant d'être une barrière résistante aux composés présents dans le milieu extérieur (antibiotiques, toxines, protéases, détergent...), l'autre étant d'avoir une perméabilité sélective. Alors que son premier rôle est assuré par la nature même du LPS, son second est plus complexe car il requiert de nombreux acteurs : les protéines de membrane externes. Elles représentent environ 70% de la masse de la membrane, et participent à de nombreux processus qui incluent l'apport de nutriments par le transport, la sécrétion, l'adhésion, la signalisation, la biogenèse... Ces protéines peuvent être soit ancrées au niveau du feuillet interne par leur N terminus (Lipoprotéines), ou soit traverser complètement la membrane grâce à une structure en tonneau β (Outer Membrane Proteins (OMPs)) (Fig. 2). Durant ma thèse je me suis intéressé plus particulièrement à cette dernière structure, dans le cadre de la voie de sécrétion de type 5, qui permet la translocation de protéines de grandes tailles vers le milieu extérieur à travers un tonneau β .

I. Biogenèse des OMPs

L'adressage et l'assemblage des protéines membranaires sont des processus complexes qui font intervenir de nombreux acteurs. Pour les protéines de membrane externe la biogenèse est d'autant plus complexe qu'elles doivent traverser la membrane plasmique et l'espace inter-membranaire (périplasma) avant d'être intégrées spécifiquement dans la membrane externe (Fig. 2). Ainsi, tous les acteurs permettant la reconnaissance et/ou l'assemblage de ces protéines doivent être capable de faire la différence entre une protéine de membrane interne, de membrane externe ou une protéine devant être sécrétée dans le milieu extérieur.

Les OMPs sont donc transportées en premier à travers la membrane interne. C'est un processus qui nécessite un apport d'énergie donc couplé avec une réaction exergonique (du Plessis et al., 2011). De plus, afin d'éviter l'agrégation ou la structuration prématurée, les domaines hydrophobes de la protéine doivent être protégés de l'aquosité du périplasma, tout ceci avant d'être correctement intégrés et structurés dans la membrane externe sans aucun apport d'énergie. Le périplasma est en effet dépourvu d'ATP et la membrane externe ne permet pas la formation d'un gradient électrochimique utilisable pour fournir de l'énergie à un processus de transport (Peterson et al., 2010 ; Hagan et al., 2011).

1. Translocation des OMPs à travers la membrane interne :

Le transport des OMPs à travers la membrane cytoplasmique se fait par la translocase Sec. Il est médié principalement par le complexe SecYEG formant le pore de translocation, associé à la protéine SecA fournissant l'énergie au système.

Les protéines devant traverser la membrane interne sont synthétisées dans le cytoplasme avec une extension N-terminale. L'adressage vers le complexe Sec se fait par la reconnaissance de cette séquence N-terminale de la pré-protéine. Nommée « peptide signal », cette séquence se compose d'environ 25 acides aminés divisés en 3 régions : N-H-C, comprenant des résidus chargés positivement (N), un segment hydrophobe (H) suivi du site de coupure (C) (Driessen and Nouwen, 2008) (Fig. 3). A la différence des protéines qui seront exportées à travers la membrane cytoplasmique, les protéines devant être intégrées à la membrane cytoplasmique ne possèdent généralement pas de site de coupure (C) et leurs segments hydrophobes forment des hélices α plus longues permettant leur insertion stable dans la membrane.

Dans le cas de certaines protéines appartenant au type 5 de sécrétion (Autotransporteurs, protéines de type TpsA (voir chapitre II.)), le signal peptide est beaucoup plus grand (supérieur à 40 acides aminés) car il se compose d'une région supplémentaire : « l'extension N-terminale ». Comme son nom l'indique, cette extension se situe en position N-terminale du signal peptide, juste après la première méthionine. Cette extension porte un motif assez conservé et se compose principalement d'acides aminés hydrophobes et aromatiques (Fig. 3). La fonction de cette extension n'est toutefois pas encore bien définie. Par exemple dans

le cas de l'autotransporteur EspP, sa délétion n'entraîne pas de problème de translocation à travers la membrane interne mais une accumulation dans le périplasma. Cette extension n'aurait pas de fonction dans l'adressage vers Sec, mais pourrait avoir un rôle lorsque la préprotéine se trouve dans le périplasma avant son clivage. Il a été proposé que cette extension puisse servir d'accroche transitoire à la membrane interne, qui préviendrait alors un repliement précoce dans le périplasma pouvant bloquer la translocation à travers la membrane externe (Szabady et al., 2005). Toutefois dans d'autres cas, comme par exemple pour l'hémagglutinine filamenteuse (FHA), la délétion de cette extension affecte peu le processus de sécrétion chez *Bordetella pertussis* (Lambert-Buisine et al., 1998). Elle retarderait cependant le clivage du peptide-signal et/ou ralentirait le passage de la FHA par la machinerie Sec, vraisemblablement pour mieux coordonner les traversées des membranes plasmique et externe (Chevalier et al., 2004).

	N-extension	N	H	C
FHA	MNTNLYRLVFS HVRGML VPVSEHCT	VGNTFCGRTRGQARSGARATS	LSVAPNALAWALMLACTGLPLV	THA<>QGL
HMW1	MN-KIYRLKFSKRLNALVAVSE LAR	GCDHSTEGSEKPARMKVRHLALKP	LSAMLLSLGVTIPQS	VLA<>SGL
SepA	MN-KIYYLK YCHITKSL IAVSE LAR	<u>RVTCKSHRRLSRR</u>	VILTSVAALSLSSAWP	ALS<>ATV
AIDA-I	MN-KAYSI IWSHSRQAW IVASE LAR	<u>GHGFVLAK</u>	NTLLVLAVVSTIGN	AFA<>VNI
Hbp/Tsh	MN-RIYSLR YSAVARGF IAVSE FAFAR	KCVHKSVRR	LCFPVLLIPVLFSAG	SLA<>GTV
EspP	MN-KIYSLK YSHITGGL IAVSE LSG	<u>RVSSRATGKKKHKR</u>	ILALCFLGLLQSSY	SFA<>SQM
IcsA/VirG	MN-QIH KFFCNMTQCSQ GGAGEL P	<u>VKEKTCK</u>	LSFSFPFVVGASLLLGPI	AFA<>TPL

Figure 3 : Séquence de peptide- signaux de protéines de type autotransporteur et TpsA arborant une extension N-terminale conservée (N-extension) (Jacob-Dubuisson et al., 2004). La région positivement chargée (N), le segment hydrophobe (H) et le site de coupure (C) sont moins conservées en séquence mais communs à toutes les protéines reconnues par le complexe Sec.

a) Dans le cytoplasme : Sec B et Sec A

Le peptide-signal doit donc être accessible depuis le cytoplasme, et pour éviter que les OMPs (et certaines protéines à sécréter) ne se structurent prématurément, la chaperonne SecB interagit directement avec ses 'substrats' à la sortie du ribosome. SecB aura donc comme fonction d'empêcher le repliement, et aussi de diriger la protéine vers le complexe de translocation en interagissant avec SecA. SecB est un homotétramère organisé en dimère de dimère. L'interface entre dimères s'organise en hélices α formant un sillon d'une longueur de 70 Å servant à maintenir l'état déstructuré de la protéine substrat (Fig. 4) (Xu et al., 2000). Ces différentes interfaces de fixation ont pu être décrites très précisément par l'équipe de Linda Randall et de Wayne Hubbell en utilisant la Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) (voir chapitre III). Ils ont confirmé que la protéine substrat pouvait bien se situer dans ce sillon et être stabilisée par des interactions hydrophobes. Toutefois la stabilisation de la protéine ne s'arrête pas là, puisque SecB est aussi capable de faire des interactions polaires en dehors de ce sillon sur des motifs localisés en différentes positions de surface de SecB (Crane et al., 2006). Nous pouvons supposer que cette flexibilité d'interaction est très importante pour sa fonction, puisque SecB possède un très grand

nombre de protéines 'substrats' qu'elle adresse au complexe Sec pour passer la membrane interne.

La protéine est ensuite transmise de l'homotétramère SecB vers le dimère SecA par une interaction directe entre ces 2 protéines :

Le C terminus de SecA est hautement flexible et chargé positivement, de par la fixation d'un ion zinc par 3 résidus cystéine et un résidu histidine. Cette région permet une interaction électrostatique avec un patch de résidus chargés négativement et situés sur les feuilletts β de chaque côté de SecB.

Le C terminus de SecB interagit avec le N terminus de SecA en s'insérant dans l'interface de dimérisation de SecA. L'ouverture de cette interface pourrait alors créer un sillon dans SecA permettant le passage de la protéine substrat de SecB vers SecA (Crane et al., 2005).

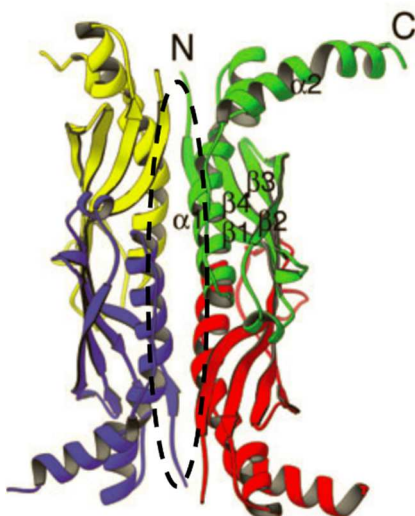


Figure 4 : Structure cristallographique du tétramère de SecB. Les N et C terminus, ainsi que les 4 brins β formant un feuillet et les 2 hélices α sont indiqués pour l'une des sous-unités. L'interface composée des 4 hélices de chaque sous-unité organisée en dimère de dimères qui forme le sillon est entourée par des pointillés (Xu et al., 2000).

SecA est une protéine centrale du complexe Sec, qui possède une activité ATPase et interagit avec presque tous les acteurs du complexe Sec. Actuellement de nombreuses structures de SecA sont disponibles, et montrent pour la plupart un dimère organisé de manière antiparallèle. Chaque protomère est divisé en plusieurs sous-domaines structuraux dont NBF1 et NBF2 qui contiennent la fonction motrice (« moteur DEAD ») permettant l'hydrolyse de l'ATP. Celle-ci induit les changements de conformation de SecA nécessaires pour la translocation de la protéine substrat. Son interaction directe avec le canal SecYEG couplé avec la réaction exergonique va permettre à la protéine substrat de progresser dans le pore.

b) Membrane Interne : SecYEG

Le canal de translocation est composé de 3 protéines intégrées dans la membrane cytoplasmique et formant un complexe stable. Cet hétéro-complexe a été conservé au cours de l'évolution puisqu'il est aussi présent chez les archéobactéries et les eucaryotes (Sec61 $\alpha\gamma\beta$). La première structure du complexe provient de celui d'une archéobactérie *Methanococcus jannaschii* (van den Berg et al., 2004). Le pore du canal est formé par les 10 hélices α transmembranaires de la protéine SecY (Sec61 α) qui peut être divisée en 2 sous-unités symétriques comprenant d'un côté les hélices 1 à 5 et de l'autre 6 à 10 (Fig. 5A).

Chaque moitié est organisée avec 2 hélices plus internes et 3 plus externes. La forme du canal peut faire penser à un sablier avec un resserrement central formant un joint étanche composé de 6 résidus hydrophobes (des Isoleucines chez *E. coli*) pointant vers l'intérieur canal (Fig. 5B). Coté cytoplasmique, le canal possède une ouverture d'environ 25 Å pouvant servir de zone d'interaction avec SecA et/ou la protéine à transporter. Ce pore est obstrué du côté périplasmique par une hélice α qui est une extension de l'hélice 2 (Fig. 5A). L'utilisation d'agents de réticulation photo-activables a permis ici de piéger certaines étapes de la translocation de SecYEG. Ainsi, le signal-peptide de la protéine substrat est capable de s'insérer entre les hélices 2 et 7 qui sont situées vers l'avant du canal coté cytoplasmique (Plath et al., 1998). Cette interaction peut alors séparer les 2 sous-unités, ce qui aurait comme conséquence de déplacer la partie de l'hélice α 2 obstruant le pore pour ouvrir ce dernier. La présence de cette hélice est très intéressante dans une protéine de membrane interne car nous verrons par la suite que nous retrouvons ce même type de structure à l'intérieur de certaines OMPs du type 5. Cette hélice n'est pas indispensable puisque sa délétion n'entraîne pas de défaut de translocation (Maillard et al., 2007). Cependant de manière plus étrange, si un pont disulfure vient bloquer cette hélice avec une cystéine introduite dans SecE, afin de stabiliser la forme ouverte (Fig. 5B), alors cette mutation entraîne un phénotype létal pour la bactérie (Harris and Silhavy, 1999). Des mesures d'électrophysiologie réalisées sur ce pore ont ainsi montré que, dans sa forme au repos, ce canal était imperméable aux ions et possédait une très faible conductance. Dans un variant où l'hélice est manquante, la conductance du pore est augmentée reflétant un pore plus ouvert. De même l'utilisation du double mutant cystéine montre un passage d'ions quand le pont disulfure est formé (l'hélice est en interaction avec SecE), tandis que le pore redevient imperméable aux ions à l'ajout d'une molécule qui rompt les ponts disulfures (Dithiothréitol), suggérant que l'hélice est retournée dans le pore (Saparov et al., 2007).

SecYEG ne sert pas qu'à exporter des protéines vers le périplasme, ce canal permet aussi l'insertion de protéines dans la membrane interne. Dans ce cas la partie transmembranaire de la protéine à insérer doit être en contact avec la bicouche lipidique. Cette insertion se ferait alors par une ouverture latérale du canal entre les hélices 2-3 et 7-8 lors d'un changement de conformation induit par la rupture de la liaison 2-7 lors de l'interaction avec le peptide-signal. Il doit donc s'agir d'un canal extrêmement dynamique, dans laquelle la forme ouverte latéralement doit être stabilisée par la présence de la protéine à intégrer dans la membrane, empêchant l'influx de lipides à l'intérieur du canal.

La stabilisation de SecY se fait aussi essentiellement par SecE qui se compose de 3 hélices transmembranaires chez *E. coli*. Ces hélices se situent autour de SecY et plus particulièrement à l'arrière de la zone d'ouverture latérale permettant ainsi de stabiliser les 2 côtés du canal.

Chez les bactéries, la troisième protéine (SecG) du complexe de translocation est différente de celle présente chez les eucaryotes ou Archées (Sec61 β). Elle possède 2 hélices transmembranaires proches du N terminus de SecY et n'est pas essentielle pour la translocation chez *E. coli*.

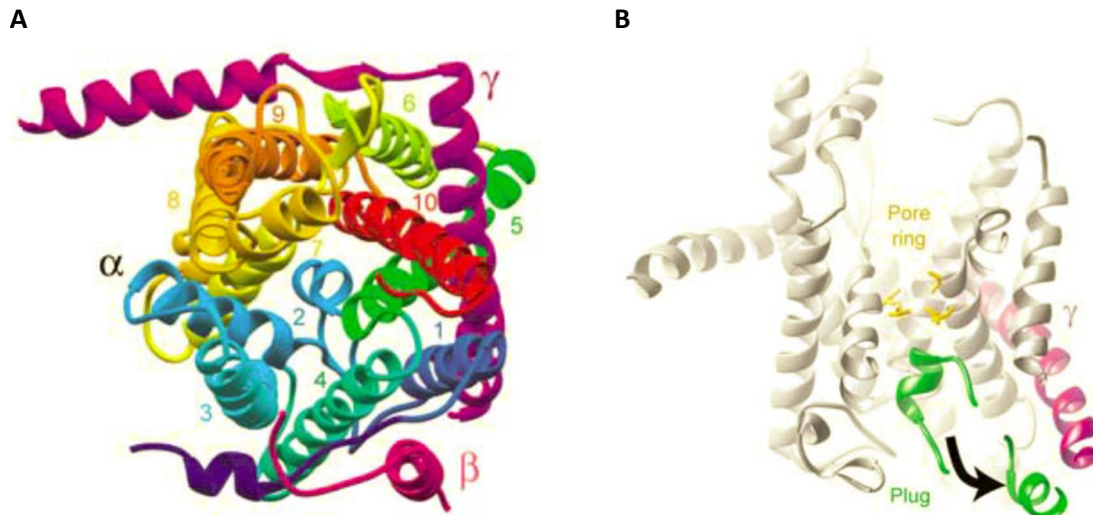


Figure 5 : vue cristallographique du complexe SecYEG de Methanococcus jannaschii. A, vue cytoplasmique du canal formé de SecY (α) entouré de SecE (γ , violet) et de SecG (β , rose). Le canal est composé des 10 hélices α de SecY, est bouché côté périsplasmique par l'extension de l'hélice 2 structuré en hélice α (bleu). B, vue de côté du canal montrant le resserrement central formé de l'anneau hydrophobe. Le déplacement de l'hélice 2 est modélisé en vert.

2. Intégration des OMPs dans la membrane externe :

a) Dans le périplasma : les chaperonnes

Comme vu précédemment avec la chaperonne SecB dans le cytoplasme, les OMPs qui traversent la membrane cytoplasmique vont interagir avec des chaperonnes périsplasmiques. En empêchant un repliement prématuré, cette interaction va permettre aux OMPs de conserver un état compétent pour leur insertion/sécrétion dans la membrane externe. Elle permet donc aussi de protéger la cellule d'une accumulation d'agrégats protéiques dans le périplasma qui deviendrait alors toxiques, et/ou d'une mauvaise mise en place dans la membrane externe, ce qui compromettrait sa perméabilité. Deux chaperonnes ont ainsi été identifiées pour leur rôle dans la biogenèse des OMPs : Skp (Seventeen kiloDalton protein) et SurA (Survival protein A). Toutes les 2 possèdent une activité de fixation spécifique aux OMPs non structurées. Ainsi SurA a été identifiée car son absence entraîne une mauvaise maturation des porines (OMPs). Ici nous nous intéresserons plus particulièrement à Skp qui est capable d'interagir directement avec les OMPs qui émergent du périplasma depuis la machinerie Sec. Par ailleurs nous verrons par la suite que cette chaperonne est capable de stabiliser des protéines impliquées dans la sécrétion de type 5 (voir paragraphe Autotransporteurs) (Ieva et al., 2011).

Skp est une protéine trimérique avec une structure qui ressemble étrangement à une méduse. Chaque monomère est composé de 2 domaines : un domaine d'oligomérisation formé de 2 hélices α et 4 brins β qui forment une structure rigidifiée par des liaisons hydrophobes, et un second domaine tentaculaire organisé en hélices α de grande taille (Fig. 6A). Quand Skp est sous forme trimérique cette partie très flexible de la protéine est capable d'accueillir une protéine substrat qui est stabilisée par le domaine d'oligomérisation formant

un tonneau β composé des feuillets β de chaque monomère (Walton and Sousa, 2004). Skp va alors reconnaître et stabiliser de manière spécifique la portion protéique des OMPs qui doit former un tonneau β . Ceci a été illustré par des expériences réalisées en présence de Skp et d'OmpA qui possède à l'instar des transporteurs de type 5b (voir suivant, chapitre II : TpsB) un domaine transmembranaire formé d'un tonneau β et un domaine périplasmique soluble (Fig. 6B). Le spectre RMN d'OmpA montre qu'en présence de Skp ce domaine périplasmique est capable de se structurer correctement alors que le tonneau β reste non structuré. L'analyse plus poussée du temps de corrélation rotationnelle (T_c) de la protéine (voir suivant, chapitre III : RPE) montre par ailleurs que cette partie périplasmique d'OmpA possède un temps de corrélation plus faible que celui attendu pour une protéine de cette taille en interaction avec Skp. Ceci suggérerait donc que seule la partie transmembranaire d'OmpA pourrait être en interaction avec Skp, alors que la partie soluble périplasmique serait structurée vers l'extérieur du complexe (Fig. 6B). L'insertion de cystéines à différents endroits de la structure a permis de montrer que seules les cystéines placées dans la cavité de Skp sont capables de piéger des cystéines situées sur le tonneau β d'OmpA (Walton et al., 2009).

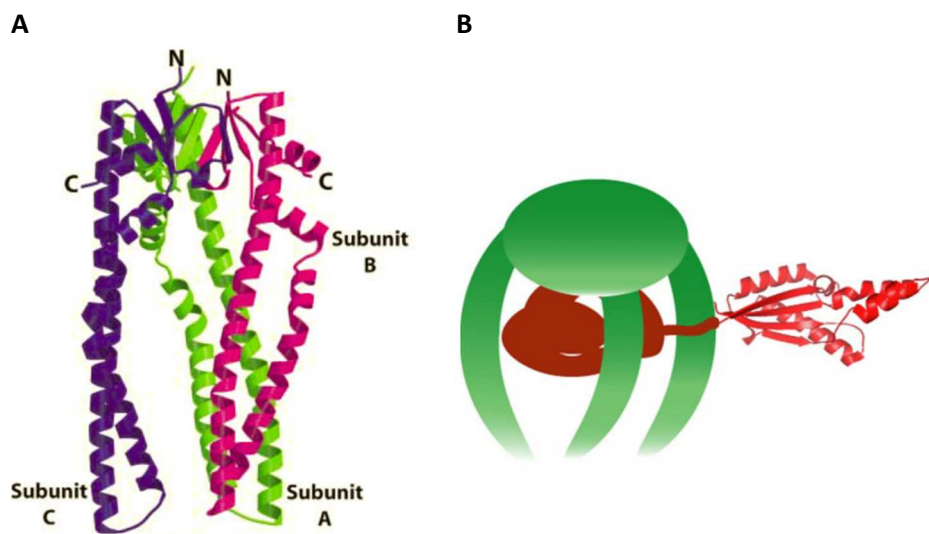


Figure 6 : A, Vue de côté d'une structure d'un trimère de Skp. A chaque couleur correspond une sous-unité. B, Modèle de Skp (vert) interagissant avec une OmpA (marron). La partie transmembranaire de cette OMP est stabilisée par l'interaction avec le corps de Skp, alors que la partie périplasmique de l'OMP est structurée (Walton et al., 2009).

b) Membrane externe : Le complexe Bam

La majorité des OMPs possèdent une séquence caractéristique située à leur C terminus. Elle se compose d'une phénylalanine C-terminale, et d'un résidu hydrophobe (souvent aromatique) en position -3 du C terminus (très souvent une tyrosine). Les résidus en positions -5, -7 et -9 sont eux plus variables, toutefois il s'agit toujours de chaînes latérales hydrophobes, donnant le caractère amphipatique à ce brin β . Des expériences de mutagenèse sur cette séquence peuvent affecter ou empêcher la mise en place de l'OMP dans la membrane externe. Ainsi ce motif, mais surtout la présence de la phénylalanine serait la clef de la reconnaissance qui permet l'insertion membranaire. Par ailleurs, l'analyse de cette séquence montre de subtiles mais importantes différences d'une espèce bactérienne à une autre pouvant conférer une certaine spécificité. Par exemple, chez les bactéries du genre *Neisseria*, la séquence C-terminale des OMPs possède un acide aminé chargé (Arg ou Lys) en position -2 (Fig. 7). L'expression de ces protéines dans une souche d'*E. coli* entraîne une létalité avec une absence de mise en place de ces OMPs dans la membrane. La substitution de la Lysine en position -2 par une Glutamine entraîne un assemblage correct des OMPs de *Neisseria* dans la membrane externe d' *E. coli* (Robert et al., 2006).

Protein	Function	Distance from C-Terminus									
		10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
<i>E. coli</i> OMPs	PhoE	Porin	I	V	A	V	G	M	T	Y	Q F
	OmpC	Porin	I	V	A	L	G	L	V	Y	Q F
	OmpF	Porin	T	V	A	V	G	I	V	Y	Q F
	LamB	Maltoporin	T	F	G	A	Q	M	E	I	W W
	OmpT	Protease	I	T	T	A	G	L	K	Y	T F
	PagP	Lipid A palmitoyl transferase	V	Y	F	A	W	M	R	F	Q F
	Tsx	Nucleoside channel	G	Y	L	V	V	G	Y	N	F
	FadL	Long-chain fatty acid transporter	L	F	G	T	N	F	N	Y	A F
	Hbp	Autotransporter	A	I	N	A	N	I	R	Y	S F
	Pet	Autotransporter	A	I	N	A	N	F	R	Y	S F
	FhuA	Siderophore receptor	Q	V	V	A	T	A	T	F	R F
	PorA	Porin	A	S	V	G	L	R	H	K	F
<i>N. meningitidis</i> OMPs	PorB	Porin	A	G	V	G	L	R	H	K	F
	NspA	unknown	E	L	S	A	G	V	R	V	K F
	Opa	Adhesin	E	V	S	L	G	M	R	Y	R F
	Opc	Adhesin	E	Y	G	L	R	V	G	I	K F
	Iga	Autotransporter	S	G	Q	I	K	I	Q	I	R F
	App	Autotransporter	S	A	G	I	K	L	G	Y	R W
	FrpB	Siderophore receptor	D	V	R	L	G	V	N	Y	K F
	LbpA	Lactoferrin receptor	N	F	S	L	A	L	E	M	K F

Figure 7 : Alignement des 10 acides aminés C-terminaux des tonneaux β des protéines de membrane externe chez E.coli et Neisseria meningitidis (Robert et al., 2006).

Omp85 a été découverte d'abord dans la membrane externe de *Nisseria meningitidis* (Voulhoux, 2003). Jan Tommassen et ses collaborateurs ont montré que le gène codant Omp85 était essentiel, et que sa délétion entraînait un défaut dans la biogénèse des OMPs. C'est ainsi qu'en 2003, Omp85 a été identifiée comme la protéine responsable de l'insertion des OMPs dans la membrane externe des bactéries Gram-négatives. Il s'agit d'une protéine extrêmement bien conservée au cours de l'évolution avec des homologues présents chez toutes les bactéries à Gram négatif, et plus généralement chez les bactéries didermes, dont font partie également des bactéries à Gram positif possédant une pseudo-membrane externe (exemple : certaines Firmicutes). Sa présence dans les membranes externes des mitochondries (Sam50/Tob55), et des chloroplastes (Toc75) suggère que ce type de protéine est apparu au cours de l'évolution des procaryotes avant la première endosymbiose.

L'étude d'Omp85 a permis de montrer que cette protéine faisait partie d'un complexe multiprotéique nommé Bam (β barrel assembly machinery). BamA (qui correspond à Omp85) est essentielle à ce complexe, les autres membres (Bam B, C, D, E) correspondent à des lipoprotéines qui n'ont pas toutes été conservées au cours de l'évolution. L'équipe de Jan Tommassen s'est ensuite intéressée au fonctionnement de BamA. Ils ont découvert que cette protéine avait des propriétés de canal et qu'elles étaient similaires à celles décrites pour HMW1B, un membre de la famille des TpsB (sécrétion de type 5b, voir chapitre II). Dans ces expériences *in vitro*, l'interaction avec des OMPs dénaturées, ou seulement le dernier brin β de ces OMPs, entraîne une augmentation de la conductance de BamA, suggérant que la reconnaissance est couplée avec une ouverture du canal (Robert et al., 2006).

Cette reconnaissance est faite par les domaines N-terminaux de BamA. Nommés POTRA (Polypeptide Translocation Associated) ces domaines sont bien définis car ils possèdent un repliement caractéristique formé de 2 hélices α antiparallèles recouvrant 1 feuillet de 3 brins β (β - α - α - β - β) et il sont composés d'environ 75 acides aminés (Fig. 8A) (Kim et al., 2007; Ricci and Silhavy, 2012). Leur nombre est variable, allant de 1 chez la mitochondrie à 7 chez certaines bactéries. BamA d'*E. coli* en possède 5, numérotés P1 à P5 à partir du N terminus de la protéine (Fig. 8B).

Des expériences de délétion ont montré que les domaines P1 et P2 de BamA n'étaient pas indispensables pour la viabilité cellulaire, mais les domaines P3-P4-P5 sont beaucoup plus importants et particulièrement le Potra5 qui est le plus proche du canal formé dans la membrane externe. En plus d'être essentiel pour la reconnaissance du substrat, ce dernier POTRA permet le recrutement des membres BamC, BamD et BamE du complexe Bam (Ricci and Silhavy, 2012).

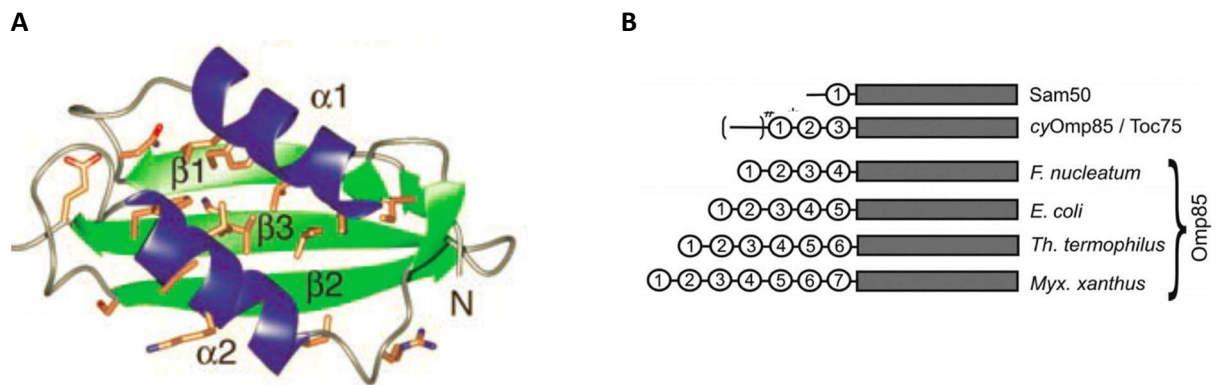


Figure 8 : Représentation des domaines POTRA. A, vue cristallographique du domaine Potra2 d'*E. coli* possédant une organisation structurale caractéristique β - α - α - β - β de ces domaines (Kim et al., 2007). B, schéma des homologues de BamA (Omp85) de différentes origines (mitochondrie, chloroplaste, cyanobactérie, bactérie) portant un nombre varié de domaines POTRA (cercles) situés en position N-terminale des domaines transmembranaires (rectangles) (Arnold et al., 2010).

Bien que les différents acteurs indispensables à l'insertion des OMPs dans les membranes aient pu être identifiés, de nombreuses questions restent en suspens sur le mécanisme de fonctionnement. Dans la littérature diverses hypothèses sont couramment avancées pour expliquer le phénomène d'intégration. Ainsi la reconnaissance entre l'OMP et BamA pourrait se faire par β -augmentation, c'est-à-dire qu'un brin β de l'OMP (très certainement le dernier brin β C-terminal) reconnaîtrait un feuillet β déjà formé (sans doute ceux présents dans les domaines POTRA de BamA) (Kim et al., 2007). Cette interaction initiale se déplacerait en suivant les sillons hydrophobes des domaines POTRA jusqu'à atteindre le tonneau β . L'insertion pourrait se faire, soit à l'interface lipide-BamA, car à cet endroit la présence de BamA pourrait désorganiser localement la structure des lipides facilitant ainsi l'insertion d'une protéine (Fig. 9A), soit par la formation d'un tonneau β mixte composé de BamA et de l'OMP. Ce dernier modèle implique que BamA puisse s'ouvrir latéralement, laissant s'insérer chaque brin β de l'OMP, pour finalement se refermer en séparant le tonneau β mixte et libérant cette OMP dans la bicouche lipidique (Fig. 9B). Dans ce modèle il n'est non plus pas exclu qu'une désorganisation locale des lipides puisse faciliter le phénomène d'ouverture et d'insertion latérale.

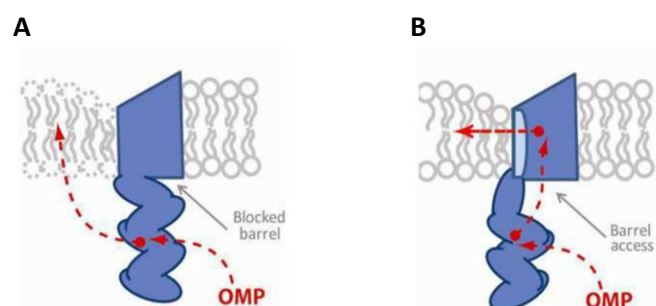


Figure 9 : représentation de 2 mécanismes que BamA pourrait utiliser pour l'insertion des OMPs dans la membrane externe. A, par l'interface protéine-lipide ou B, couplée avec une ouverture latérale de BamA (Noinaj et al., 2013).

Actuellement aucun des modèles n'a été complètement validé, mais la résolution récente de la structure de BamA pourrait apporter de nouvelles pistes pour comprendre son mécanisme de fonctionnement. En effet depuis ces dernières années de nombreuses structures de domaines POTRA sont disponibles. Mais aucune structure du tonneau β n'avait été cristallisée. Comme les protéines de type Omp85/BamA possèdent de grandes homologies avec les TpsB (voir Chapitre II, description des TpsB), depuis 2007 la communauté se basait sur notre structure de FhaC qui a été la première structure disponible de cette superfamille. Toutefois très récemment, en fin 2013, et donc durant ma thèse, la structure complète de BamA a été résolue par l'équipe de Susan Buchanan (Noinaj et al., 2013). Ces résultats suivis de la résolution d'une autre Omp85 (TamA, (Gruss et al., 2013)) nous ont permis de modifier légèrement notre structure de FhaC.

L'équipe de Susan Buchanan a cristallisé deux structures de BamA provenant de 2 espèces bactériennes : *N. gonorrhoeae* (forme complète) et *Haemophilus ducreyi* (tronquée, où il manque les 3 premiers domaines POTRA) présentant 2 conformations sensiblement différentes (Fig. 10 A et B) (Noinaj et al., 2013). La partie C-terminale est formée de 16 brins β anti-parallèles qui forment un cylindre stabilisé par un réseau de ponts hydrogène présents entre brins adjacents. Ce tonneau est fermé par l'appariement non covalent des premier et dernier brins β ($\beta 1$ - $\beta 16$). Les brins β sont inclinés par rapport à l'axe du tonneau et l'alternance de résidus polaires/non-polaires permet au tonneau d'exposer vers l'extérieur une surface hydrophobe en contact permanent avec les queues hydrophobes des lipides, et à l'inverse, d'avoir des résidus polaires orientés vers l'intérieur pour former un pore hydrophile. Ces brins sont reliés par de courtes boucles périplasmiques et 8 boucles plus longues à la surface cellulaire (nommée L1 à L8) avec une partie de L4 structurée en hélice α orientée parallèlement à la membrane. Dans cette conformation ces boucles extracellulaires forment un dôme pouvant protéger l'intérieur du tonneau β . La 6ème de ces boucles (L6) est partiellement insérée à l'intérieur du tonneau. Cette boucle porte à son extrémité le motif VRGF/Y (Val-Arg-Gly-Phe/Tyr) qui est extrêmement bien conservé et indispensable à la fonction des protéines de la superfamille Omp85/TpsB (Delattre et al., 2010). L'importance de cette boucle L6 a été très étudiée dans la littérature, et diverses expériences de délétions ou de remplacement d'acides aminés de ce motif dans BamA ont montré un impact majeur de ces modifications sur l'assemblage de toutes les OMPs (Leonard-Rivera and Misra, 2012). Même si son importance a été largement décrite, nous ne connaissons toujours pas son rôle dans le fonctionnement de la protéine.

Entre les 2 structures de BamA la forme du tonneau est sensiblement la même, toutefois certaines subtiles différences pourraient refléter le mécanisme de fonctionnement. Ces différences sont par exemple visibles dans le nombre de liaisons entre le $\beta 1$ et $\beta 16$. En effet le tonneau β de *H. ducreyi* semble plus fortement stabilisé, puisque l'interface $\beta 1$ - $\beta 16$ se compose de 8 ponts hydrogène, contre seulement 2 pour *N. gonorrhoeae* qui montre une torsion dans son brin $\beta 16$. Ce manque de stabilisation pourrait être important dans le mécanisme de mise en place des OMPs dans la membrane externe. La deuxième différence structurale, qui doit être en lien avec celle observée précédemment, est la présence du Potra5 très proche du tonneau β chez *N. gonorrhoeae*. Cette proximité permet au Potra d'être stabilisé par des liaisons avec des boucles périplasmiques du tonneau, alors que chez

H. ducreyi ce dernier est éloigné du tonneau β par un déplacement d'environ 70° , ne faisant aucune interaction avec le bas du tonneau. Dans cette conformation, l'intérieur du canal est plus ouvert vers le périplasma, et cette différence d'interface Potra5-tonneau β entre les 2 structures pourrait alors refléter un mécanisme d'ouverture du canal rendant l'intérieur accessible depuis le périplasma (Noinaj et al., 2013).

L'étude comparative de ces 2 conformations, et l'utilisation de la dynamique moléculaire ont permis aux auteurs de tester la possibilité d'une ouverture latérale. En reproduisant *in silico* l'environnement lipidique de BamA, l'analyse du paramètre d'ordre de la queue hydrophobe des lipides montre que ce dernier est 3 fois moins ordonné pour les lipides proches du brin β C-terminal comparé à ceux proches des brins β de l'autre côté du tonneau. Cette différence est aussi retrouvée dans l'épaisseur membranaire avec une réduction de l'ordre de 16 Å pour la portion proche du brin β 16. Cette déstabilisation de l'environnement lipidique local proche de l'interface β 1- β 16 permettrait ainsi de faciliter l'insertion dans la membrane des OMPs.

Une ouverture latérale du tonneau β de BamA a même été observée lors de simulations en dynamique moléculaire. Les simulations montrent que pour les 2 structures de BamA, une ouverture est possible par l'éloignement des brins β 1 et β 16. Cette ouverture n'est toutefois pas de même ampleur, car pour *H. ducreyi* qui possède un tonneau β plus stabilisé (voir plus haut), elle démarre de 4 Å en vue cristallographique et évolue jusqu'à 7,5 Å. En revanche, chez *N. gonorrhoeae*, qui possède une torsion de son brin β 16, la séparation des brins β 1 et β 16 peut se faire jusqu'à 10 Å, ce qui reflète une conformation d'ouverture plus grande (Fig. 10 C et D).

Les 2 structures de BamA de *N. gonorrhoeae* et *H. ducreyi* pourraient correspondre à 2 états conformationnels du mécanisme de BamA. L'accès par le périplasma serait contrôlé par un système d'ouverture lié au déplacement du Potra5. Les OMPs passeraient alors dans le tonneau et utiliseraient les brins β 1 et β 16 de BamA issus de l'ouverture latérale comme modèle pour initier la formation du tonneau β des OMPs par le mécanisme de β augmentation. Il se formerait alors un complexe transitoire, sans doute stabilisé par le Potra5 et peut-être aussi par la boucle L6 conservée. Une fois le tonneau β des OMPs formé, il serait relâché dans la membrane externe lorsque que le complexe BamA-OMPs se séparerait par un mécanisme encore inconnu. Bien que ces dernières informations nous apportent des pistes importantes pour la compréhension, il est toutefois nécessaire de préciser qu'il ne s'agit que de simulations. Même si cette ouverture latérale est possible *in silico*, elle n'exclut pas l'autre modèle qui est indépendant d'une ouverture du tonneau β de BamA. Les OMPs présents dans le périplasma interagiraient avec les domaines POTRA. Cette interaction leur permettrait de se rapprocher de la membrane externe et s'insérer directement par l'environnement localement déstabilisé de la membrane proche du β 16.

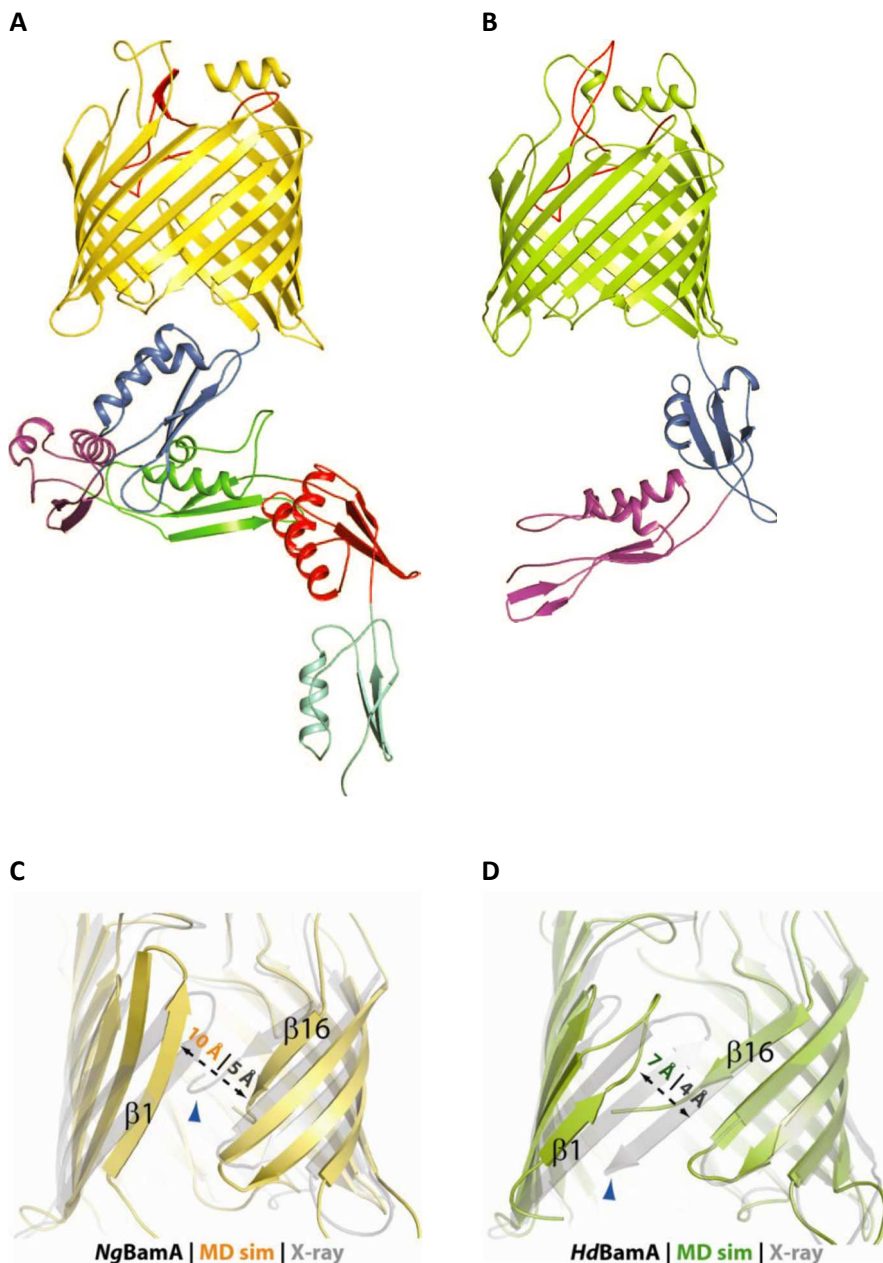


Figure 10 : Structure cristallographique de BamA. A, Structure complète de N. gonorrhoeae et B, Structure de BamA de H. ducreyi où les trois premiers domaines POTRA sont manquants. Les boucles extracellulaires forment un dôme au-dessus du canal, avec la boucle L4 structurée en partie en hélice α . La boucle L6 qui rentre partiellement dans le canal est représentée en rouge. C, et D, Représentation de l'ouverture latérale après une simulation de dynamique moléculaire d'environ 1 μ s réalisée sur les tonneaux β des protéines de N. gonorrhoeae et H. ducreyi. L'ouverture est visualisée par une augmentation de distance entre les brins $\beta 1$ et $\beta 16$ entre la forme cristallographique (5Å et 4Å respectivement) et des formes plus ouvertes présentes à certains moments des simulations (10Å et 7Å). La flèche bleue indique la localisation du C terminus observé sur la structure cristallographique.

De nombreuses données restent encore à découvrir sur le fonctionnement du complexe Bam, à savoir par exemple comment ses différents composants (BamA et les lipoprotéines) interagissent ensemble dans un but commun. Ces modèles d'insertion membranaire et les simulations *in silico* ne sont qu'un pas vers la compréhension des mécanismes de fonctionnement des protéines de type Omp85.

Comme nous venons de le voir dans cette première partie d'introduction, de nombreux complexes protéiques ont été identifiés (et pour certains caractérisés fonctionnellement) car indispensables pour le transport et l'insertion de protéines dans la membrane externe. Tous ces acteurs sont ainsi utilisés par les protéines de la voie de sécrétion de type V.

II . Classification de la sécrétion de Type V

Cette nomenclature a été proposée par Henderson afin que la communauté scientifique puisse différencier la sécrétion des autotransporteurs et le système de sécrétion de type 2. En effet ces 2 systèmes de sécrétion utilisent la machinerie Sec. Mais en plus d'avoir un peptide-signal plutôt atypique, les autotransporteurs et autres membres du type 5 n'utilisent pas les machineries du type 2 pour passer la membrane externe (Henderson et al., 2000). En effet le type 5 représente un mécanisme de sécrétion plutôt simple puisqu'il utilise essentiellement des complexes protéiques déjà mis en place et essentiels pour la survie bactérienne (machineries Sec et Bam). Ce type de sécrétion ne comprend pas uniquement la sécrétion des autotransporteurs de type classique (5a), mais regroupe aussi la sécrétion de type TPS (Two-Partner Secretion) originalement appelée : « unlinked autotransporters » (5b), et des autotransporteurs de type trimérique (5c) (Henderson et al., 2004). Actuellement, le type 5 de sécrétion comprend aussi les sous-types « d » et « e », que nous verrons par la suite.

J'ai choisi de diviser cette partie en 2 catégories en séparant les systèmes de type 5a 5c et 5e, des systèmes TPS (type 5b) qui nous le verrons plus tard, ont des domaines transmembranaires ne partageant pas les mêmes caractéristiques fonctionnelles que ceux des autotransporteurs classiques. Les systèmes 5d seront décrits après les systèmes TPS puisqu'ils représentent une variation de ces derniers.

1 AUTOTRANSPORTEURS

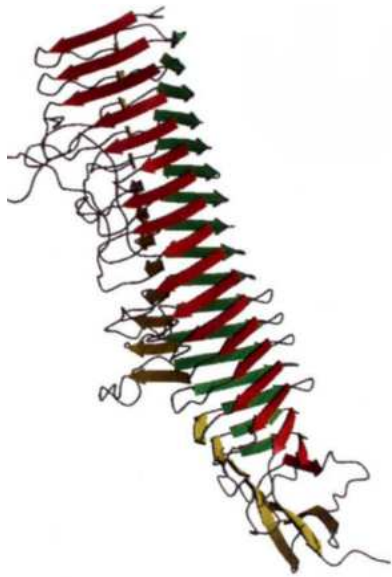
a) T5a : «autotransporteurs classiques»

Le premier membre, découvert en 1987, était la protéase d'IgA de *N. gonorrhoeae*. Retrouvée dans le milieu de culture, cette protéase clive spécifiquement les immunoglobulines humaines de type IgA1. L'étude de cette protéine révèle que l'IgA protéase est produite sous forme d'un précurseur possédant 3 domaines fonctionnels. Elle porte en position N-terminale un peptide-signal permettant le passage à travers la membrane interne, suivi du domaine protéase qui se retrouve dans le milieu extérieur grâce au domaine C-terminal décrit alors comme le « helper domain » qui forme un pore dans la membrane externe. Ce dernier domaine est indispensable puisqu'il permet au domaine protéase d'IgA d'avoir une conformation active et soluble. Ce domaine est alors relâché dans le milieu extérieur grâce à une activité autocatalytique (Pohlner, 1987).

Depuis, de nombreux autres autotransporteurs aux fonctions diverses ont été identifiés. Toutefois, tous sont organisés de la même manière. Une séquence de signal-peptide, un domaine passager d'une taille généralement supérieure à 100 kDa qui porte un ou plusieurs domaines correspondant aux fonctions de la protéine et pouvant être relargués ou non dans le milieu extérieur, et enfin un domaine C-terminal d'environ 30 kDa formant un tonneau β ancré dans la membrane externe.

Bien que le domaine passager puisse varier en fonction ou en taille, la plupart sont prédits pour être organisés en une structure allongée et linéaire de type hélice β . C'est par exemple le cas de la Pertactine identifiée pour la première fois chez *B. pertussis* comme une protéine d'environ 60 kDa pouvant se retrouver dans le milieu extérieur (Leininger et al., 1991). Il s'agit en fait d'un autotransporteur de 93 kDa possédant un tonneau β carboxy-terminal de 30 kDa, et un domaine passager d'environ 60 kDa qui peut être relargué dans le milieu extérieur après un traitement thermique ou à l'acide. Ce domaine passager est une adhésine qui possède deux motifs riches en résidus proline (PRRs : Proline-rich regions) ainsi qu'un motif Arg-Gly-Asp (RGD) lui permettant son attachement à plusieurs protéines d'adhésion à la surface des cellules de mammifères (fibronectine, intégrine...). Bien que la protéine entière n'ait pu être cristallisée, la structure de son domaine passager a été résolue à 2,5 Å. Comme prédit pour d'autres ATs, il est essentiellement formé de brins β qui s'organisent en hélice β à base triangulaire (Fig. 11A). Parfois quelques boucles reliant des brins β peuvent être de plus grande taille, et donc dépasser de la base triangulaire. Ces boucles peuvent porter plusieurs fonctions de la protéine, comme ici le motif d'adhésion RGD. L'intérieur de cette hélice β est très stable car composé de chaînes latérales aliphatiques qui interagissent pour former un cœur hydrophobe (Leu, Ile, Val, Ala) (Fig. 11B) (Emsley et al., 1996).

A



B



C

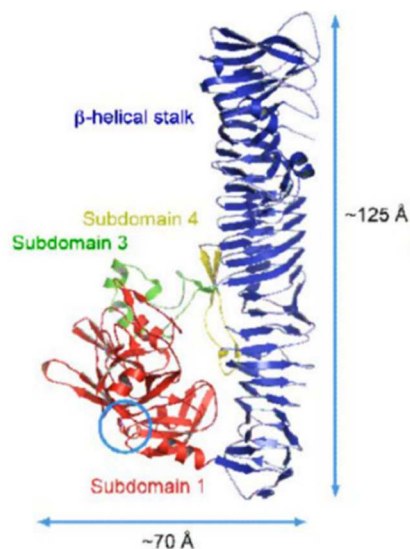


Figure 11 :

Domaines passagers d'autotransporteurs.

A, structure cristallographique du domaine passager de la pertactine en forme d'hélice β . B, vue de l'intérieur, les chaînes latérales des résidus aliphatiques sont colorées en violet. C, structure cristallographique du domaine passager de EspP. En plus de sa structure en hélice β , il possède une partie globulaire (organisée en sous-domaines 1,3,4) avec la fonction 'SPATE' (voir texte). Le site catalytique (entouré en bleu) est porté par le sous-domaine 1 (Khan et al., 2011).

La partie C-terminale des autotransporteurs correspond à un tonneau de 12 brins β comme le montre par exemple la structure de NalP (Fig. 12A). Ces brins sont reliés par de courtes boucles périplasmiques et des boucles extracellulaires plus longues. A l'intérieur du tonneau se trouve une hélice α reliant le domaine passager au premier brin du tonneau. Dans cette conformation cette dernière semble bloquer le canal, les formes cristallisées correspondent donc à la dernière étape de la biogenèse, c'est-à-dire une fois que le domaine passager a été exporté. Il a donc été proposé que le canal soit fermé par cette hélice α , empêchant ainsi l'accumulation de pores ouverts qui pourraient rendre la membrane externe perméable à de nombreux solutés (Oomen et al., 2004). L'autotransporteur EspP est un peu plus particulier, il est issu d'une souche d'*E.coli* pathogène provoquant d'importantes diarrhées. Le domaine passager de cet autotransporteur appartient aux 'SPATES' (Serine

Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae) et possède donc une activité de protéase à sérine. Une fois transporté et libéré dans le milieu, ce dernier va agir sur les protéines des mammifères, contribuant ainsi aux symptômes de la maladie (Fig. 11C) (Barnard et al., 2007). Nous pouvons voir sur la vue cristallographique du domaine transmembranaire que l'hélice α est tronquée, en fait une grande partie de cette hélice accompagne le domaine passager (Fig. 12 B et C). Toutefois la petite portion restante subit un changement conformationnel de 90° au moment de l'autoprotéolyse qui relargue le domaine passager. Ce changement de conformation s'accompagne aussi du repliement de la boucle extracellulaire 5 vers l'intérieur du pore, ces 2 changements permettraient alors d'augmenter la stabilité du tonneau β en venant le boucher (Barnard et al., 2007).

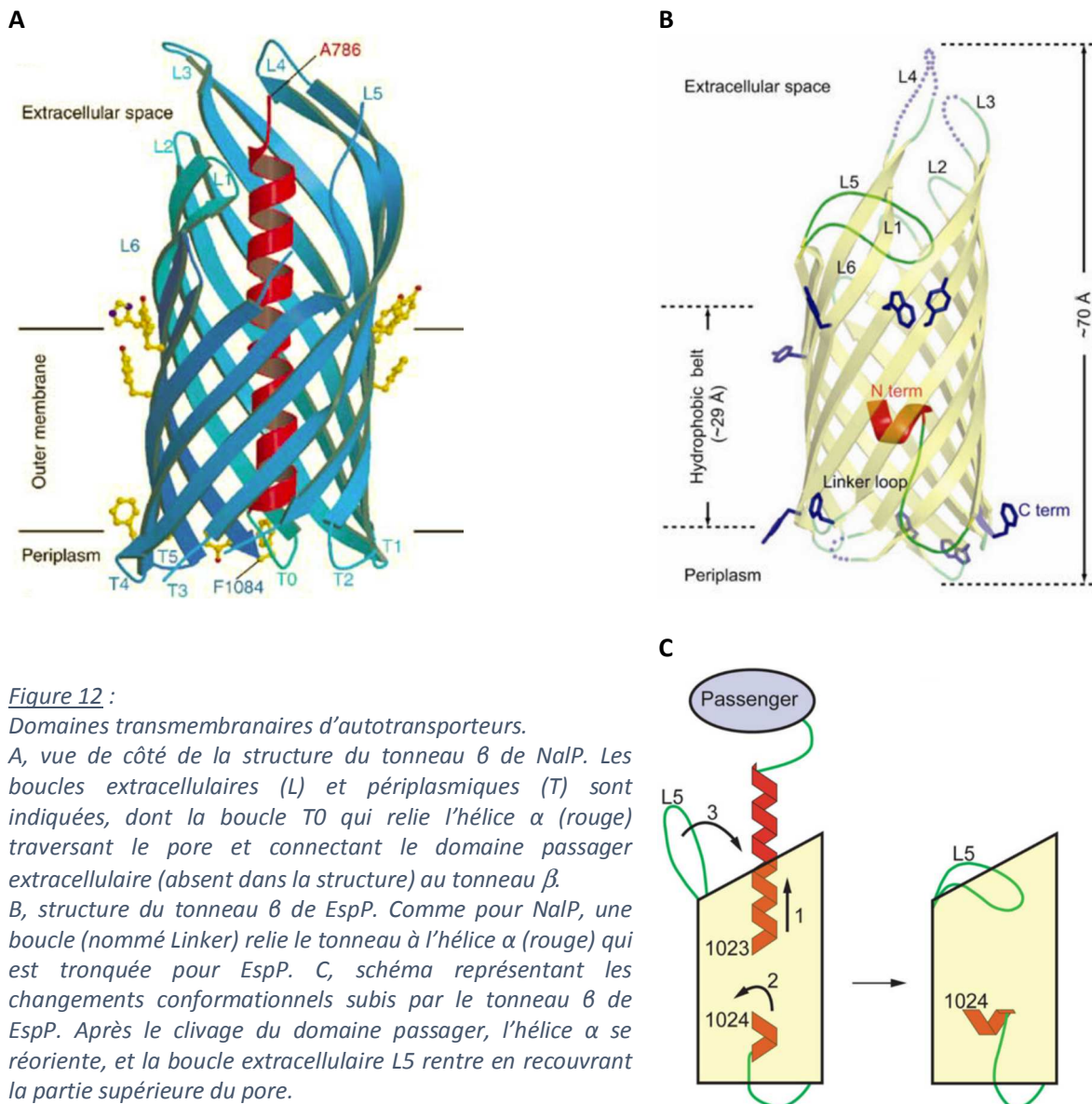


Figure 12 :

Domaines transmembranaires d'autotransporteurs.

A, vue de côté de la structure du tonneau β de NalP. Les boucles extracellulaires (L) et périplasmiques (T) sont indiquées, dont la boucle T0 qui relie l'hélice α (rouge) traversant le pore et connectant le domaine passager extracellulaire (absent dans la structure) au tonneau β .

B, structure du tonneau β de EspP. Comme pour NalP, une boucle (nommé Linker) relie le tonneau à l'hélice α (rouge) qui est tronquée pour EspP. C, schéma représentant les changements conformationnels subis par le tonneau β de EspP. Après le clivage du domaine passager, l'hélice α se réoriente, et la boucle extracellulaire L5 rentre en recouvrant la partie supérieure du pore.

Ce qui nous manque actuellement est une vision dynamique de cette sécrétion, afin de comprendre la temporalité des différentes étapes qu'elle requiert. A savoir, est-ce que l'étape de mise en place du tonneau β dans la membrane par le complexe Bam est couplée avec la translocation du domaine passager ? Et à quel point le complexe Bam agit-il sur cette translocation ? Pour observer ces formes discrètes, il est nécessaire dans les systèmes de sécrétions de les figer afin de les observer. C'est à mon sens un des aspects les plus compliqués de ces études, puisque cela implique de bloquer en les stabilisant des conformations transitoires, très dynamiques, qui apparaissent lors de processus rapides, sans bien entendu entraîner une dégradation des complexes protéiques.

L'équipe de Bernstein a réussi ce pari sur EspP, en insérant 11 acides aminés au milieu du domaine passager empêchant ainsi le reste de sa translocation. L'utilisation d'agents de réticulation photo-activables placés à différents endroits du domaine passager d'EspP couplé avec cet état bloqué en cours de translocation a permis de piéger le complexe Bam. Ils ont ainsi pu observer 2 endroits où il y a une interaction avec le complexe Bam : dans le domaine passager, les résidus proches de la région d'insertion des 11 acides aminés, sont proche du tonneau β de BamA. Le domaine transmembranaire de l'autotransporteur peut aussi être en interaction avec BamA et BamB. Ceci suggère donc que le complexe Bam joue un rôle direct dans la translocation du domaine passager et que ce transport serait coordonné avec l'insertion du domaine transmembranaire de l'autotransporteur par BamA.

Durant leurs expériences de 'cross-linking', ils ont pu piéger des intermédiaires périplasmiques, tous uniquement en interaction avec la chaperonne Skp. Ainsi grâce à ces données, et à la lumière des connaissances actuelles, un modèle de la sécrétion des Autotransporteurs semble pouvoir se dessiner (Fig. 13). A la sortie du système Sec, la chaperonne Skp interagirait avec le domaine passager par reconnaissance de brins β amphipatiques mais aussi avec le domaine β de l'autotransporteur. Ce domaine serait alors déjà partiellement structuré en « pré-tonneau β » dans lequel l'hélice α serait mise en place. Le complexe Autotransporteur-Skp serait alors dirigé vers la membrane externe, et la reconnaissance du motif C-terminal du tonneau β par BamA entrainerait sa mise en place dans la membrane externe aidé par son interaction avec BamB et BamD. A cette étape, Skp ne serait plus en interaction avec le tonneau β , mais uniquement avec le domaine passager qui pourrait alors être en contact aussi avec les domaines POTRA de BamA. Il y aurait alors translocation du domaine passager en commençant par son C terminus suivi de sa libération dans le milieu extérieur (Ieva and Bernstein, 2009, Ieva et al., 2011). Après cette étape, le tonneau β ne serait donc plus en interaction avec le complexe Bam, et il posséderait une structure finale stabilisée que l'on peut caractériser aux rayons X (Oomen et al., 2004; Barnard et al., 2007).

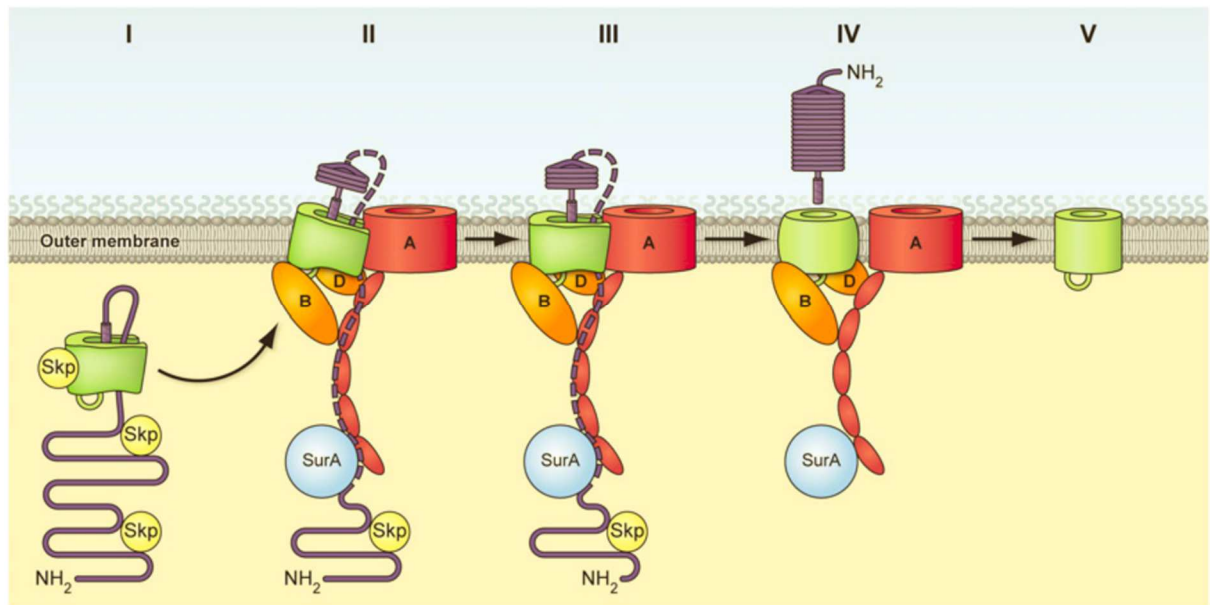


Figure 13 : Modèle de la biogenèse d'un autotransporteur (ici EspP) par le complexe Bam. Dans ce modèle, la structure du tonneau β (de couleur verte) pourrait se préformer dans le périplasme aidé par la chaperonne Skp qui maintient aussi le domaine passager. Ensuite la translocation du domaine passager se ferait durant l'insertion du domaine transmembranaire par BamA. Enfin la séparation avec le complexe Bam n'interviendrait qu'après le clivage du domaine passager dans le milieu extérieur (Ieva et al., 2011).

Bien que certaines réponses aient pu être apportées par ce modèle qui demande encore à être complètement confirmé, plusieurs questions sont encore en suspens. Nous ne savons toujours pas si le domaine passager transite à travers la membrane externe uniquement grâce au domaine transmembranaire, ou par le canal de BamA, ou par un tonneau mixte formé par un complexe BamA-autotransporteur. De même nous savons que le tonneau β de l'autotransporteur est en interaction avec BamA, mais par quel mécanisme ce dernier se sépare-t-il de BamA ? De quelle énergie dispose le système pour permettre de tel changement de conformation ?

La question de la source d'énergie permettant ces changements conformationnels est cruciale pour l'ensemble du type 5 de sécrétion, puisque la translocation de ces protéines n'est ni couplée à une hydrolyse d'ATP, ni à une force proton-motrice (Peterson et al., 2010 ; Hagan et al., 2011). Encore beaucoup de données restent à découvrir sur cette question. Toutefois pour la translocation du domaine passager, des éléments de réponses sont proposés dans la littérature. Ainsi dans de nombreux autotransporteurs un domaine 'auto-chaperone' a été identifié en position C-terminale du domaine passager. Il s'agit d'une région d'environ 15 kDa qui est détectée en premier à la surface cellulaire, avant le reste du passager. Des expériences réalisées sur les autotransporteurs Hbp et EspP, ont montré que la présence de mutations ponctuelles dans cette région entraînaient un défaut de repliement pour l'ensemble du domaine passager (Peterson et al., 2010 ; Soprova et al., 2010). Comme pour le reste du domaine passager, cette région est structurée en hélice β , mais c'est son repliement qui permettrait au domaine passager d'acquies sa structure. Ainsi ce domaine autochaperone pourrait alors servir de 'patron' pour le reste du domaine

passager. La différence d'énergie libre entre la forme non repliée et la forme repliée, plus stable, fournirait l'énergie pour la translocation. Ceci expliquerait qu'aucun apport extérieur d'énergie ne soit requis pour la translocation du domaine passager, et de manière plus générale pour la translocation dans la voie de sécrétion de type 5 puisque ce même processus serait utilisé pour la sécrétion des TpsA via leur domaine TPS (voir plus bas, sécrétion à deux partenaires).

b) T5c : « autotransporteurs trimériques »

Comme les autotransporteurs classiques, les autotransporteurs trimériques sont formés d'un domaine passager ainsi que d'un domaine transmembranaire C-terminal. Toutefois, ce dernier domaine est plus petit que celui des autotransporteurs classiques. Les protéines sont assemblées dans la membrane externe en trimère, avec 4 brins β pour chaque sous-unité formant ainsi un tonneau de 12 brins β (Fig. 14A). La structure du domaine transmembranaire de Hia (*H. influenzae*) (Meng et al., 2006), montre une structure de tonneau β proche de celui des autotransporteurs classiques, toutefois, l'intérieur du tonneau dont le diamètre est de 18 Å est encombré par 3 hélices α organisés en une structure de type « coiled coil ». Chacune provenant d'une des 3 sous-unités, elles sont reliées au tonneau β par une boucle qui est essentielle pour la stabilité du trimère (Fig. 14B).

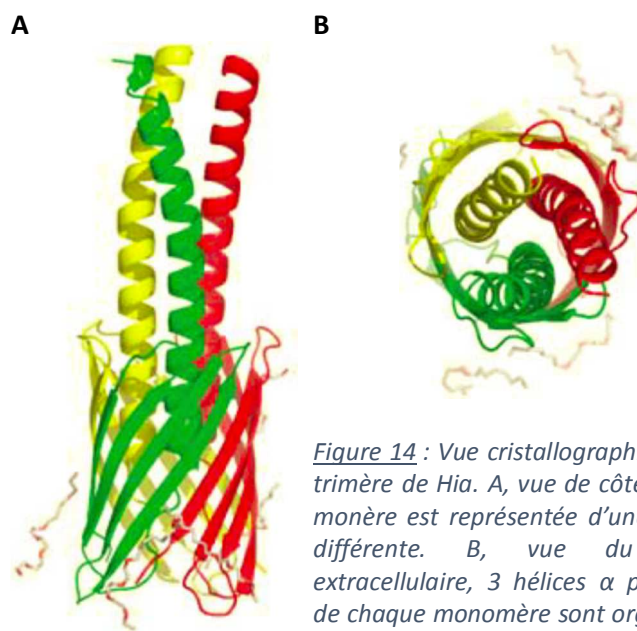


Figure 14 : Vue cristallographique d'un trimère de Hia. A, vue de côté, chaque monomère est représentée d'une couleur différente. B, vue du milieu extracellulaire, 3 hélices α provenant de chaque monomère sont organisés en « coiled coil » dans le tonneau β . (Meng et al., 2006)

Contrairement au tonneau β , les domaines passagers sont différents de ceux des ATs classiques. Leur architecture est beaucoup plus complexe car ils sont formés de nombreux éléments structuraux en répétition avec une fréquence et un ordre des répétitions variables. Par exemple chez Hia de *H. influenzae*, avant les 3 hélices α se succèdent 5 types de domaines différents avec une répétition de ces domaines le long de la séquence du domaine passager (Trp-ring ; Neck ; KG ; TTT ; GANG). (Meng et al., 2008). Chaque monomère de Hia est composé de 1098 résidus.

Il est très intéressant de noter qu'un autotransporteur trimérique homologue à Hia est présent chez *H. influenzae*. Nommé Hsf, il possède exactement la même structure que Hia, à la grande différence que son domaine passager se compose d'une plus grande répétition de ces 5 types de domaines (environ le double, puisque le monomère de Hsf comprend 2414 résidus). Hsf est un autotransporteur trimérique retrouvé uniquement dans les souches encapsulées à la place de Hia. Ces protéines ont été identifiées comme des facteurs d'adhérence à l'épithélium respiratoire pour ces bactéries pathogènes causant otite, sinusite, pneumonie pour les souches non capsulées, et méningite et septicémie pour les souches capsulées. Les domaines passagers possèdent deux domaines de fixation d'affinité différente organisés le long de la structure trimérique. Ainsi le domaine le plus éloigné de la membrane externe bactérienne permettrait la fixation initiale au tissu cible, qui peut être déplacé par l'affinité plus élevée au second site de fixation qui est plus proche de la surface bactérienne. On peut supposer ici que l'autotransporteur trimérique Hsf des souches encapsulées reflète une adaptation qui a débuté par la multiplication des domaines de Hia. Ainsi il permet au domaine passager de conserver son rôle d'adhésion et de rapprochement malgré la présence de la capsule bactérienne. Cette architecture modulable en domaines répétés n'est pas spécifique à *Haemophilus*, mais nous la retrouvons dans tous les autotransporteurs trimériques. Pour l'instant, tous sont décrits pour avoir une fonction d'adhésine permettant par exemple la fixation aux cellules eucaryotes, l'interaction avec des protéines de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagène), la formation de biofilms... Aucun des domaines passagers étudiés n'a été retrouvé dans le milieu extérieur, laissant supposer qu'ils ne sont pas clivés à la surface cellulaire. Par conséquent leur grande taille leur permettrait d'être largement exposés à la surface cellulaire, dépassant ainsi l'antigène O, le LPS et la capsule (Meng et al., 2008).

Cette variabilité et ces recombinaisons trouvées au sein des domaines passagers pourraient aussi s'expliquer par leurs expositions aux défenses de l'hôte. La pression du système immunitaire conduirait à la formation de différentes sortes d'autotransporteurs trimériques (par échange, répétition et recombinaison d'éléments) exposés à la surface cellulaire de la bactérie, à la différence des autotransporteurs plus classiques qui peuvent éviter que la réponse immunitaire ne soit dirigée contre la bactérie qui les porte, en relarguant leur domaine passager par clivage protéolytique.

Ces autotransporteurs restent encore peu décrits dans la littérature. Mais dans mon sujet de thèse, et pour comprendre comment ce mécanisme de sécrétion se met en place, il est nécessaire de s'interroger sur la biogénèse de leur mise en place dans la membrane externe. La difficulté ici est de comprendre alors comment 3 domaines transmembranaires peuvent

s'assembler dans la membrane pour laisser passer 3 domaines passagers. Lors de l'étude sur YadA, les auteurs ont montré que la mise en place de cet autotransporteur trimérique était dépendante du complexe Bam (Lehr et al., 2010). Et qu'à l'instar des autres OMPs, tous les autotransporteurs trimériques disposent d'un motif C-terminal permettant leur reconnaissance par le complexe Bam (Robert et al., 2006). Même si nous savons actuellement que l'insertion dans la membrane se fait par Bam, il est difficile de comprendre la temporalité de cette mise en place. Quand une sous-unité d'un autotransporteur trimérique interagit avec Bam, est-ce que ce dernier attend l'arrivée d'une deuxième puis d'une troisième sous-unité avant de continuer son cycle d'intégration dans la membrane externe ? Cette idée suggérerait alors qu'un à temps donné, un à plusieurs complexe(s) Bam pourrai(en)t être bloqué(s) en interaction avec une ou deux sous-unité(s) d'un autotransporteur trimérique. Ceci pourrait alors être délétère pour la cellule, puisqu'il y aurait alors un ralentissement de la mise en place de toutes les autres OMPs. La deuxième solution pourrait alors être que la trimérisation se fasse dans le périplasma avant l'interaction avec Bam, ce qui impliquerait une formation de structure secondaire puis tertiaire avant l'insertion dans la membrane externe. Donc en sortie de Sec, les chaperonnes périplasmiques pourraient interagir avec le domaine transmembranaire (comme vu précédemment pour Skp avec OmpA), mais alors à quel moment se passe la trimérisation ? Elle pourrait probablement se faire par les hélices α qui sont indispensables pour la trimérisation du domaine transmembranaire (Meng et al., 2006). Ainsi le tonneau trimérique pourrait-être déjà pré-formé dans le périplasma avec les hélices α à l'intérieur avant son intégration par le complexe Bam. Cette idée, où les hélices seraient déjà à l'intérieur du tonneau préformé a été préalablement formulée pour les autotransporteurs classiques (Ieva et al., 2011). Toutefois, avec ces hélices α à l'intérieur, il est difficile d'imaginer la translocation du domaine passager à travers ce pore encombré. Le domaine passager pourrait alors plutôt transiter à travers BamA. Ainsi d'importants points sur la translocation des autotransporteurs trimériques restent encore inconnus. De plus, à la différence des domaines passagers des autotransporteurs classiques qui ont une architecture assez simple en hélice β , l'acquisition de structures différentes des domaines passagers des autotransporteurs trimériques est beaucoup plus complexe. Car durant le temps d'une translocation, les 3 sous-unités doivent acquérir une structure en trimère qui comprend des domaines organisés en hélice α de type « coiled coil » et des brins β organisés en feuillets.

Un élément de réponse a été apporté récemment par l'équipe de Dirk Linke. En travaillant sur l'autotransporteur trimérique SadA de *Salmonella*, ils ont découvert que le gène était en opéron avec *sadB* qui code pour une lipoprotéine de la membrane interne (Grin et al., 2014). SadB est un homotrimère qui serait capable d'assister SadA juste après sa translocation par la machinerie Sec. Ainsi SadB serait capable d'interagir avec 3 sous-unités de SadA, favorisant leur rapprochement avant leur interaction avec BamA. Il pourrait donc s'agir d'une adaptation à ce type de sécrétion qui nécessite alors la production d'une protéine spécifique supplémentaire.

c) T5e : « autotransporteur inversé »

La sécrétion de type 5e n'a été que très peu décrite, par ailleurs sa place parmi le type 5 est encore en discussion (Tsai et al., 2010 ; Oberhettinger et al., 2012 ; Grijpstra et al., 2013). Car ces protéines disposent de toutes les caractéristiques des autotransporteurs classiques, mais à la différence qu'elles ont une orientation inversée, c'est-à-dire que le N terminus de la protéine correspond au domaine transmembranaire qui est alors suivi du domaine passager au C terminus. Identifiés car ils correspondent à des facteurs de virulence, les exemples présents dans la littérature sont ceux des intimines de la souche *E. coli* entéro-pathogénique et des invasines de *Yersinia pseudotuberculosis* qui sont des protéines homologues. Leur domaine transmembranaire est similaire à ceux des autotransporteurs classiques avec une structure en tonneau à 12 brins β . Toutefois le segment reliant le tonneau aux domaines passagers traverse le pore en conformation étendue, au lieu d'être structuré en hélice α comme celui des autotransporteurs (Oomen et al., 2004; Meng et al., 2006). Cependant, nous pouvons voir sur la structure aux rayons X (Fig. 15A), que ce segment est replié en hélice α dans le périplasme. En revanche sa délétion n'affecte pas la protéine (Fairman et al., 2012). La reconnaissance avec la machinerie Bam se fait par la présence de la séquence signature des OMPs qui n'est pas ici situé au C terminus de la protéine, mais au C terminus du domaine transmembranaire (Fairman et al., 2012). De manière intéressante, le résidu Phénylalanine qui se retrouve habituellement en position C-terminale de la protéine, est remplacé dans ce cas par une Leucine. Ainsi la production du domaine transmembranaire seul de l'invasine dans *E. coli* n'est pas possible à moins de remplacer cette leucine par une phénylalanine (Fairman et al., 2012).

Comme pour les autotransporteurs, le domaine passager porte la fonction de la protéine. Celui-ci n'est toutefois pas structuré en hélice β , mais en domaines globulaires en tandem composés de brins β . Ces domaines sont au nombre de 5 pour l'invasine (Fig. 15B), et portent des motifs d'adhésion aux cellules eucaryotes. Par exemple pour les invasines de *Yersinia*, ces domaines permettent la reconnaissance des récepteurs cellulaires de type β 1-intégrine. Cette fixation va alors réorganiser le cytosquelette de la cellule et causer la formation d'un pseudopode qui enveloppera la bactérie (Hamburger, 1999). Chez les *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC), le fonctionnement des intimines est couplé avec une sécrétion de type 3 qui injecte dans les cellules épithéliales intestinales un récepteur membranaire (Tyr) qui s'exprime à la surface cellulaire. Les intimines peuvent alors fixer ce récepteur et engendrer une réorganisation du cytosquelette en provoquant la formation d'une structure en piédestal riche en actine. C'est cette structure qui va provoquer par la suite les lésions intestinales qui conduisent aux symptômes de la maladie (Tsai et al., 2010).

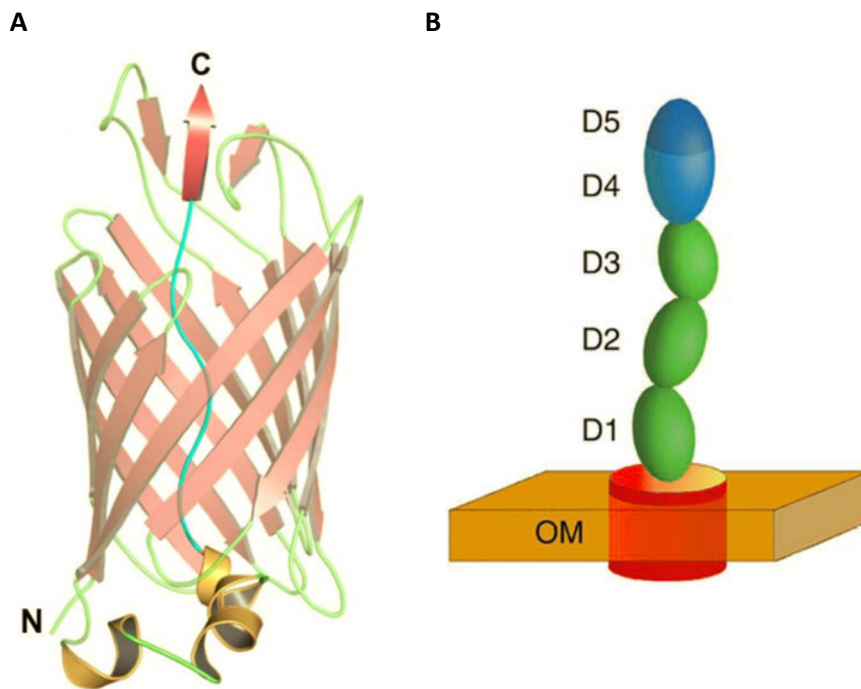


Figure 15 : Représentation des membres du type 5e de sécrétion. A, structure cristallographique du domaine transmembranaire de l'intimine. Le domaine passager C-terminal est relié au tonneau par un segment traversant le pore en conformation étendue, lui-même relié par une hélice α périplasmique. B, schéma de l'organisation des différents domaines de l'invasine.

➤ Conclusion sur les protéines de type Autotransporteur :

Depuis la première description d'un autotransporteur en 1987 (Pohlner, 1987), de nombreuses études ont montré que beaucoup de ces protéines sont d'importants facteurs de virulence qui contribuent à la pathogénicité des bactéries. Au départ les mécanismes induisant la sécrétion pouvaient sembler simples : un domaine passager transporté dans le milieu extracellulaire par son domaine transmembranaire en tonneau β . Mais la découverte du complexe Bam (Voulhoux, 2003) a modifié profondément cette idée. De plus les résolutions de nombreuses structures des domaines transmembranaires ont montré un pore très étroit (environ 10 Å) dans lequel il est difficilement concevable que le domaine passager puisse transiter à l'intérieur tout en se structurant. Actuellement, une des hypothèses propose que l'insertion membranaire du tonneau β soit couplée avec la translocation du domaine passager. Ainsi ce domaine pourrait transiter par un tonneau élargi composé possiblement du domaine transmembranaire de l'autotransporteur et de la protéine BamA. Ainsi après la résolution du complexe hétéro-oligomérique, le domaine passager serait structuré dans le milieu extérieur avec l'incapacité de retourner dans le périplasme puisque le tonneau β du domaine transmembranaire est trop étroit. Par conséquent, le terme d'autotransporteur serait alors un nom inapproprié, puisque la sécrétion serait en fait dépendante de la protéine BamA qui fait partie de la superfamille Omp85/TpsB. Famille que je vous propose actuellement d'étudier à travers la compréhension d'un transporteur de type TpsB permettant la sécrétion de type 5b sous la dénomination TPS.

2 Systèmes TPS (et apparentés)

a) T5b : « sécrétion à 2 partenaires »

Cette voie de sécrétion a été identifiée car elle permet la translocation de protéines de hauts poids moléculaires qui sont impliquées dans différents processus de virulence. Comme son nom l'indique, elle comprend (en général) 2 protéines, la protéine sécrétée appelée aussi TpsA et son partenaire présent dans la membrane externe nommée TpsB.

TpsA

Comme pour les autotransporteurs, ces protéines peuvent posséder diverses fonctions qui jouent un rôle dans la virulence bactérienne. Certaines peuvent servir de cytolysine (ShlA, HpmA, EthA), qui par exemple dans le cas de ShlA va permettre la formation d'un pore dans les membranes riches en phosphatidylsérine causant la lyse cellulaire. D'autres TpsA sont identifiées comme des adhésines (FHA, HMW1, HecA, LspA1...). Nous verrons, par exemple, plus bas, le cas détaillé de l'hémagglutinine filamenteuse de *Bordetella pertussis* (FHA). D'autres fonctions moins majoritaires parmi les TpsA sont aussi décrites dans la littérature, comme par exemple l'acquisition de fer par la protéine HxuA, ou l'inhibition de croissance par CdiA (Jacob-Dubuisson et al., 2004 ; Aoki et al., 2010 ; Jacob-Dubuisson et al., 2013). Les TpsA peuvent donc avoir des fonctions distinctes avec des domaines fonctionnels particuliers. Toutefois, à l'instar des autotransporteurs, toutes les TpsA partagent le même mode de translocation à travers la membrane externe avec une architecture similaire. L'une des caractéristiques est leur taille : la grande majorité des TpsA sont composées de plus de 1000 acides aminés, et sont structurées en hélice β à base triangulaire formée de brins β amphipatiques en répétition. Elles sont retrouvées dans le milieu extérieur ou restent associées à la surface bactérienne.

Les TpsA portent à leur N terminus un domaine conservé d'environ 250 résidus que l'on nomme domaine « TPS ». Ce dernier permet la reconnaissance des domaines périplasmiques du second partenaire (domaines Potra). Des expériences de délétion réalisées sur deux TpsA : ShlA et FHA, ont montré qu'il était possible de supprimer toute la partie C-terminale de la protéine jusqu'au 300 premiers résidus N-terminaux contenant ce domaine TPS. Ce court fragment d'environ 30 kDa porte l'information nécessaire à sa sécrétion puisqu'il est retrouvé dans le milieu extérieur, mais aussi qu'il est capable de se structurer au cours de cette étape de translocation. C'est ainsi qu'en 2004, la structure du domaine TPS de la FHA a pu être analysée aux rayons X (Clantin et al., 2004).

FHA, un modèle de TpsA :

L'hémagglutinine filamenteuse ou FHA est l'adhésine majeure de *B. pertussis*. Il s'agit d'une protéine de haut poids moléculaire (220 kDa) qui est la protéine la plus efficacement sécrétée par *B. pertussis*. Elle est synthétisée dans le cytoplasme sous la forme d'un précurseur de 367 kDa, qui subit 2 clivages protéolytiques. Comme expliqué précédemment, la FHA, comme certains autotransporteurs et protéines TpsA, possède un long peptide-signal qui est clivé durant sa translocation du cytoplasme vers le périplasma par la machinerie Sec. Maintenu sous forme non-structurée par la chaperonne périplasmique DegP (Baud et al., 2009, 2011), la FHA interagit spécifiquement avec son transporteur TpsB nommé FhaC. Cette interaction permet à la FHA de traverser la membrane externe tout en se repliant progressivement dans le milieu extérieur. Le deuxième clivage protéolytique lui donnant sa taille finale de 220 kDa enlève le tiers C-terminal de la protéine. Il est effectué à la surface de la bactérie par un autotransporteur possédant un domaine passager de type subtilisine, nommé SphB1 (Coutte et al., 2001). Ce clivage a pour conséquence de séparer la protéine en 2 fragments, l'un d'environ 220 kDa qui porte la fonction d'adhésine et que l'on connaît bien sous le nom de FHA (Fig. 16A). Cependant, la fonction de l'autre fragment d'environ 130 kDa est largement méconnue. Il n'est pas détecté dans le milieu extérieur, ce qui laisse supposer qu'à l'inverse de la FHA, ce fragment n'est pas sécrété. S'il reste dans le périplasma, nous pouvons supposer que ce dernier se fait dégrader afin d'éviter des problèmes d'accumulation. Ce domaine serait nécessaire pour permettre aux 50 kDa C-terminaux de la FHA, qui forment un domaine non replié en hélice β , de se structurer à la surface de la bactérie (Mazar and Cotter, 2006 ; Noël et al., 2012).

L'inactivation du gène SphB1 entraîne l'aggrégation bactérienne avec un défaut de colonisation du tractus respiratoire chez la souris (Coutte et al., 2003). Comme pour certains autotransporteurs, le relargage de cette adhésine dans le milieu extérieur serait une clef de l'infection. Ainsi en favorisant le détachement de FHA, les bactéries peuvent plus facilement se disperser, permettant une meilleure colonisation. D'un point de vue cinétique, le gène de la FHA est un des facteurs transcrits en premier au début du processus d'infection, ce qui n'est pas le cas de SphB1. Ainsi des quantités importantes de FHA pourraient initialement être associées aux bactéries ce qui permettrait leur adhérence. Puis la synthèse de SphB1 entraînerait une phase de dispersion. En parallèle, contrôler la libération de la FHA, et de manière plus générale pouvoir cliver les TpsA et autotransporteurs, pourrait aussi permettre de réguler la quantité d'antigène exposée à la surface bactérienne. Par exemple, dans le cas de la FHA, la présence de SphB1 limite la phagocytose par les neutrophiles (Mobberley-Schuman and Weiss, 2005). Ainsi, dans le temps de l'infection, les formes associées ou dissociées de la FHA à la surface cellulaire permettraient à cette même protéine d'avoir plusieurs rôles et ainsi d'être régulée en fonction du stade de l'infection.

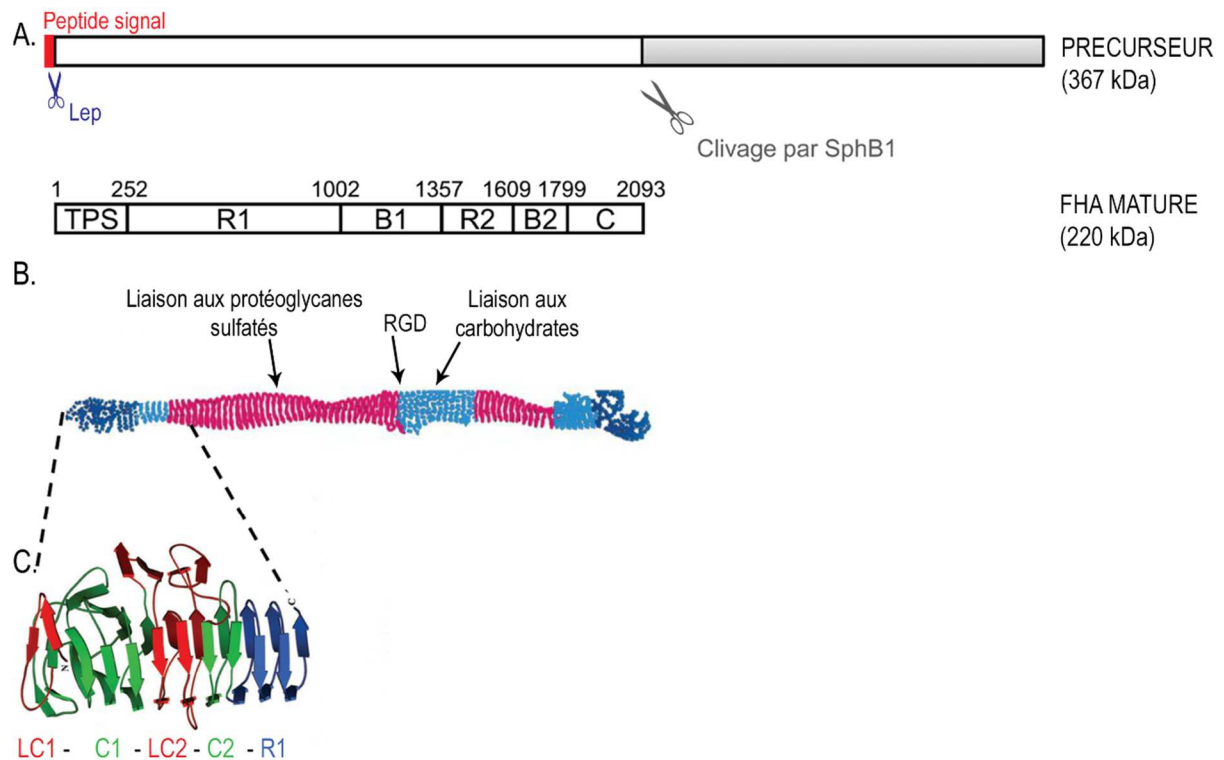
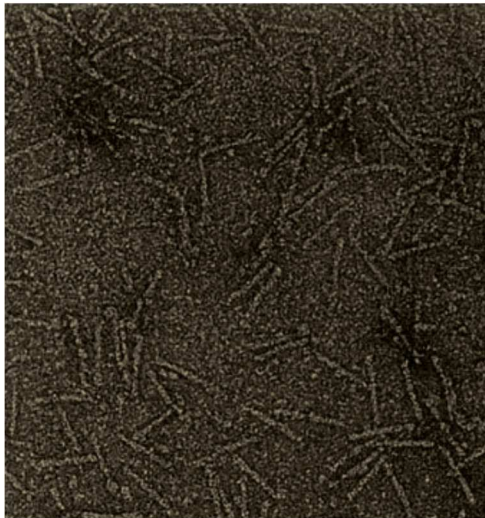


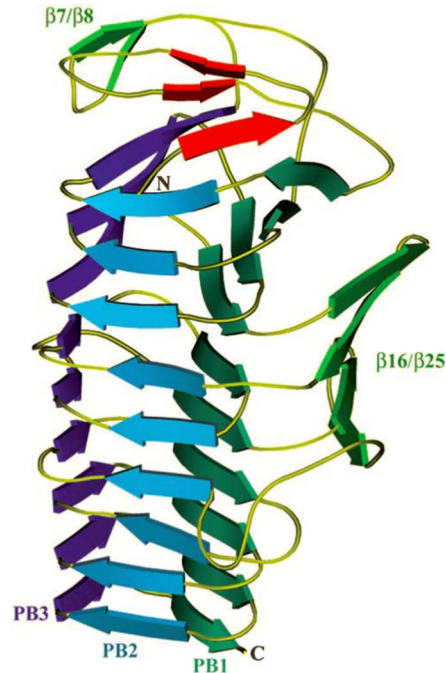
Figure 16 : Représentation schématique de la FHA. A, Les 2 clivages protéolytiques du précurseur de la FHA (367kDa) sont effectués l'un par la signal-peptidase à la sortie du complexe Sec et le second à la surface cellulaire par SphB1. B, La forme sécrétée (220 kDa) est composée de différentes régions (R1, B1, R2 et B2) en répétition et structurées en hélice β , sauf le domaine C-terminal de structure inconnue. C, Structure cristallographique de la protéine Fha30 qui correspond à la partie N-terminale de la FHA. Le fragment cristallisé, Fha30, porte le domaine TPS lui-même composé de 2 régions très conservées (C1 et C2) et 2 autres moins conservées (LC1 et LC2), ainsi que de la première partie de la région R1. (Kajava et al., 2001 ; Clantin et al., 2004).

Comme de nombreuses TpsA, FHA est de grande taille, visible en microscopie électronique sous la forme d'un bâtonnet, d'une longueur d'environ 50 nanomètres (Fig. 17A) (Makhov et al., 1994). Elle est prédite pour former une structure homogène en hélice β droite, autrement dit une hélice à base triangulaire constituée de brins β interconnectés. Son N terminus se compose du domaine TPS ; puis suivi de nombreuses répétitions, de 19 résidus environ, organisées en deux zones (R1 et R2). La fin de chacune de ces zones se caractérise par une région de répétitions moins marquées (B1 et B2). La région C-terminale ne serait pas structurée en hélice β (Fig. 16B). Due à sa grande taille et à sa faible solubilité, il n'a pas été possible de cristalliser la FHA dans sa forme complète. Toutefois, un fragment comprenant les 30 kDa N-terminaux, sécrété sous forme repliée, a pu être analysé aux rayons X. Ce fragment se compose du domaine TPS ainsi que 3 répétitions de la zone R1. Comme prédit pour le reste de la protéine, Fha30 est structurée en hélice β droite et possède plusieurs motifs structuraux extra-hélice qui ne font donc pas partie de la structure rigide du corps de l'hélice, et sont orientés vers l'extérieur de celle-ci (Fig. 16C) (Clantin et al., 2004).

A



B



C

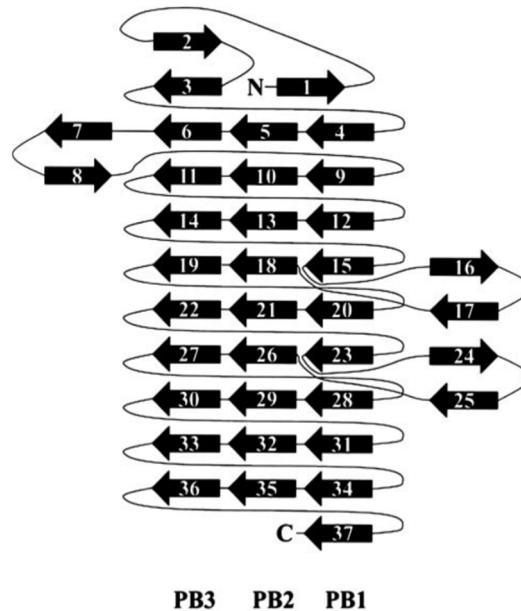


Figure 17 : Représentation de l'hémagglutinine filamenteuse de B. pertussis. A, visualisation en microscopie électronique de la FHA entière (220 kDa). B, vue cristallographique de sa forme tronquée de 30kDa (Fha30) comprenant le domaine TPS et structurée en hélice β organisée en 3 feuillets (PB1, 2, 3). Les motifs extra hélices β 7-8 et β 16-25 sont indiqués. C, diagramme topologique représentant l'organisation des différents brins β formant Fha30. (Makhov et al., 1994 ; Clantin et al., 2004)

L'analyse structurale montre que les 3 premiers brins β N-terminaux recouvrent le haut de l'hélice β et serviraient à cacher le cœur hydrophobe de cette hélice. Puis partant du N terminus les brins β formant l'hélice deviennent de plus en plus réguliers jusqu'à former un triangle isocèle au C terminus de Fha30. De même, la structure de l'hélice β montre qu'elle commence courbée, et devient de plus en plus droite. Les résidus situés sur les brins β et orientés vers l'intérieur de l'hélice sont aliphatiques, et les boucles séparant deux brins β portent en général des glycines (Fig. 17B). (Clantin et al., 2004)

Si nous comparons ce domaine TPS aux séquences d'autres TpsA (adhésines et cytolysines), 2 régions bien conservées sont identifiables, nommées C1 et C2, de tailles différentes. La première, de grande taille, se situe entre le brin β 3 jusqu'au brin β 15, tandis que la région C2

ne comprend que les brins $\beta 26$ à $\beta 29$. La région C1 semble importante puisqu'elle porte 2 motifs essentiels pour la sécrétion de certaines TpsA: NPNL (entre $\beta 8$ et $\beta 9$) et NPNGI ($\beta 12$ et $\beta 13$) (Fig. 17C). Par exemple dans le cas de la FHA ce premier motif est indispensable à la sécrétion, et le remplacement d'une asparagine par une isoleucine en position 66 ou 105 (premier et second motifs, respectivement), entraîne un problème de sécrétion probablement lié à un défaut dans l'acquisition de sa structure tertiaire (Lambert-Buisine et al., 1998 ; Hodak et al., 2006; Fan et al., 2012). Cette région conservée est suivie d'une région moins conservée (nommée LC2) qui peut différer en taille entre différentes TpsA. Sur notre structure de Fha30, cette région LC2 comprend un feuillet de 4 brins β antiparallèles qui flanque une face de l'hélice β . Ces régions et motifs structuraux ne sont pas conservés en séquence mais se retrouvent en même position dans les domaines TPS des différentes protéines dont la structure a été résolue (HpmA, Fha30, HxuA, HMW1A). Comme ils ne font pas partie du corps rigide de l'hélice β , ils pourraient jouer un rôle dans la spécificité de reconnaissance du transporteur TpsB associé (Clantin et al., 2004; Hodak et al., 2006; Jacob-Dubuisson et al., 2004).

Ainsi, l'analyse comparative de différentes séquences de TpsA et l'analyse structurale de Fha30, nous montrent que le domaine TPS s'étend du N terminus jusqu'à la région C2 (Hodak et al., 2006). Il comprend donc les sites d'interactions nécessaires à la reconnaissance de son partenaire TpsB et initie le repliement du domaine central de l'adhésine en une longue hélice β . Comme pour le domaine autochaperonne des autotransporteurs, la différence d'énergie libre entre la forme non repliée et la forme repliée, plus stable, du domaine TPS à la surface cellulaire pourrait fournir l'énergie nécessaire pour la translocation.

TpsB

Comme nous l'avons vu précédemment, ce type de transporteur sécrète de manière spécifique son (ses) partenaire(s) TpsA(s) associé(s). Ils sont présents chez de très nombreux genres de bactéries à Gram négatif (*Bordetella*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Haemophilus*, *Proteus*, *Serratia*, *Yersinia*...), et très souvent associés à des facteurs de virulences. Les TpsB possèdent une architecture similaire aux protéines de type Omp85/BamA avec en partie C-terminale un tonneau de 16 brins β ancré dans la membrane externe, portant le motif VRGF/Y sur la boucle L6 (voir plus haut), et des domaines N-terminaux périplasmiques de type POTRA. Le nombre de ces domaines est variable parmi les protéines Omp85 (de 1 à 7), mais tous les TpsB sont quant à eux prédits pour en avoir uniquement 2 (Jacob-Dubuisson et al., 2009). Les protéines de type BamA et les transporteurs TpsB forment une superfamille que l'on nomme Omp85.

FhaC, un modèle de TpsB :

FhaC a été découverte en 1994, dans le génome de *B. pertussis*. Le gène codant FhaC a été identifié dans un cluster de 6 gènes, comprenant en premier le gène codant la FHA suivi de 4 gènes codant des fimbriae (*fimA*, *fimB*, *fimC*, *fimD*) qui sont aussi des adhésines. Le dernier gène de ce cluster correspond à *fhaC*. L'insertion d'un transposon dans ce gène n'a montré

aucun effet sur la production des fimbriae mais par contre affecte drastiquement la présence extracellulaire de la FHA (Willems et al., 1994).

Comme vu précédemment, des formes tronquées de la FHA peuvent être sécrétées par *B. pertussis*. Ce système est transposable chez *E. coli*, en y transférant juste 2 gènes : celui de la FHA tronquée (de différentes tailles : 30 kDa, 60 kDa, 80 kDa) et celui de FhaC. Cette donnée est très importante puisqu'elle suggère qu'aucun autre facteur spécifique à *B. pertussis* n'est indispensable pour sécréter la FHA à travers la membrane externe, et donc que seul FhaC suffit. Ceci est la base du système à 2 partenaires, puisque les autres machineries utilisées sont communes à de nombreuses autres protéines dans les bactéries à Gram négative (transcription et traduction cytoplasmique, translocation par la membrane interne, transport périplasmique et insertion dans la membrane externe pour FhaC). Une étude récente a même montré que ce système de sécrétion pouvait être reconstitué *in vitro*, ainsi FhaC réincorporée dans une vésicule membranaire est capable de reconnaître et de transporter une protéine FHA tronquée d'environ 45 kDa comportant le domaine TPS, vers l'intérieur de cette vésicule (Fan et al., 2012). Comme pour les autres TpsB, FhaC est prédite pour être composée de nombreux brins β formant un pore ancré dans la membrane externe. C'est en 1999 qu'un premier protocole d'extraction et de purification de cette protéine membranaire a été mis au point (Jacob-Dubuisson et al., 1999). Ceci a été le point de départ de toutes les analyses *in vitro* qui ont pu être réalisées par la suite (électrophysiologie, cristallographie, translocation *in vitro*, résonance paramagnétique électronique etc...).

La preuve que les TpsB forment bien un pore dans la membrane externe, a été apportée par l'analyse électrophysiologique du canal unitaire de FhaC. Cette technique permet de suivre l'état du courant (passage d'ions) en fonction du temps (voltage fixe) sur un très faible nombre de protéines (voire une seule) (Fig. 18A). FhaC est un pore fluctuant entre un état fermé (passage d'ions nul ou faible) à un état ouvert (perméable aux ions) (Jacob-Dubuisson et al., 1999). Plus tard, une technique d'électrophysiologie 'macroscopique' a mis en évidence que FhaC pouvait être divisé en 2 domaines fonctionnels N- et C-terminaux. Ainsi la délétion du domaine N-terminal (que l'on a identifié plus tard comme les domaines POTRA) entraîne un défaut de sécrétion de la FHA, mais n'affecte pas drastiquement le passage d'ions à travers le canal qui est donc formé par la partie C-terminale. Il est donc possible d'identifier deux types de mutants de FhaC, ceux qui possèdent un défaut de sécrétion de la FHA mais conservent une activité de canal (c'est-à-dire des mutations sur les domaines POTRA qui entraînent un défaut de reconnaissance de la FHA) et ceux qui possèdent un défaut de sécrétion de la FHA avec une activité de canal affectée (c'est-à-dire les mutants du tonneau β) (Meli et al., 2006). Cette analyse a aussi mis en évidence un phénomène d'hystérésis en utilisant la technique de Montal-Muller, dans laquelle on mesure le courant « macroscopique » dû à un certain nombre de protéines insérées dans la bicouche. Dans cette technique un voltage est appliqué de -100 mV à + 100 mV (abscisse) à travers la bicouche et l'on mesure l'évolution du courant en fonction de la rampe des voltages appliqués. Ainsi l'hystérésis observée dans les voltages négatifs montre que la relation entre le voltage appliqué et le courant mesuré n'est pas la même lorsque l'on diminue le courant (de 0 mV à -100 mV) ou que l'on augmente le courant (de -100 mV à 0 mV) (Fig. 18B). Ce phénomène n'existe pas dans les voltages positifs. Ce phénomène est très intéressant

puisque'il pourrait traduire un changement de conformation. Ce qui reste très surprenant, et encore aujourd'hui inexpliqué, est que ce phénomène disparaît complètement lorsque les domaines N-terminaux (les domaines POTRA) sont retirés (Fig. 18B) (Meli et al., 2006). Plus précisément, la disparition de l'hystérésis est spécifiquement liée à la délétion du Potra2 (Clantin et al., 2007).

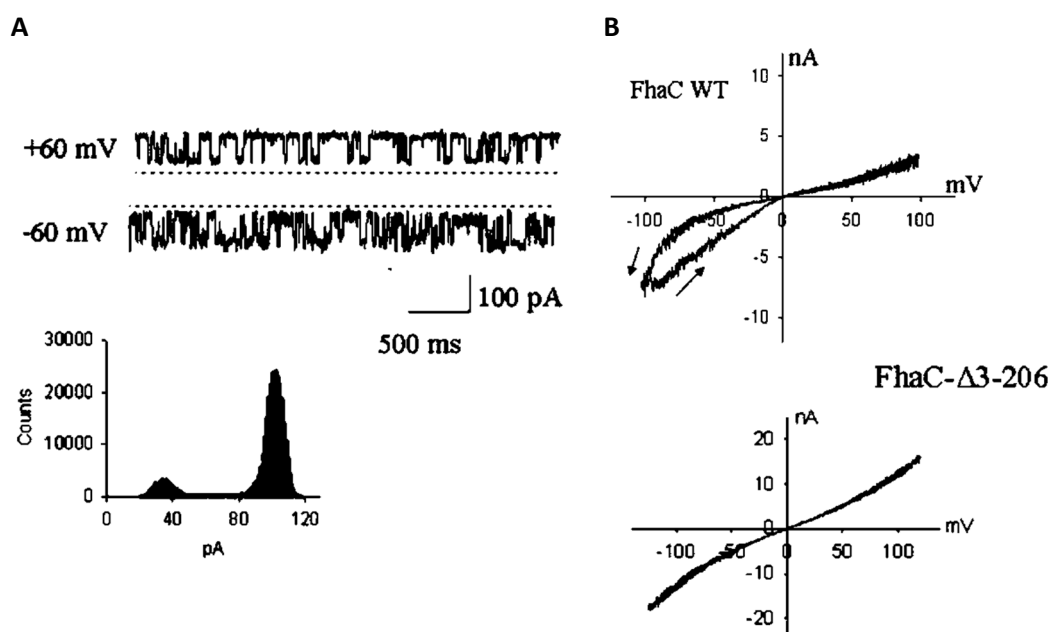


Figure 18 : Etude d'électrophysiologie réalisée sur FhaC. A, Détection en canal unitaire du courant enregistrée à +60 mV et -60 mV. L'histogramme du dessous représente 2 états de conductance différents mesurés à +60 mV, l'état de grande conductance est beaucoup plus représenté. B, Etude macroscopique représentant les intensités de courant en fonction du voltage variant de +100 mV à -100 mV pour FhaC sauvage (WT) et un mutant de FhaC dans lequel les domaines POTRA ont été retirés (Δ3-206). (Meli et al., 2006). Les flèches indiquent le sens des rampes de voltages.

FhaC a été la première protéine de la superfamille Omp85 à être cristallisée et dont la structure a pu être résolue par la technique de diffraction aux rayons X à 3,15 Å. La structure de FhaC correspond donc à sa forme sortie de la membrane et purifiée en détergent. Elle nous révèle l'organisation tridimensionnelle de cette protéine (Fig. 19A) (Clantin et al., 2007) :

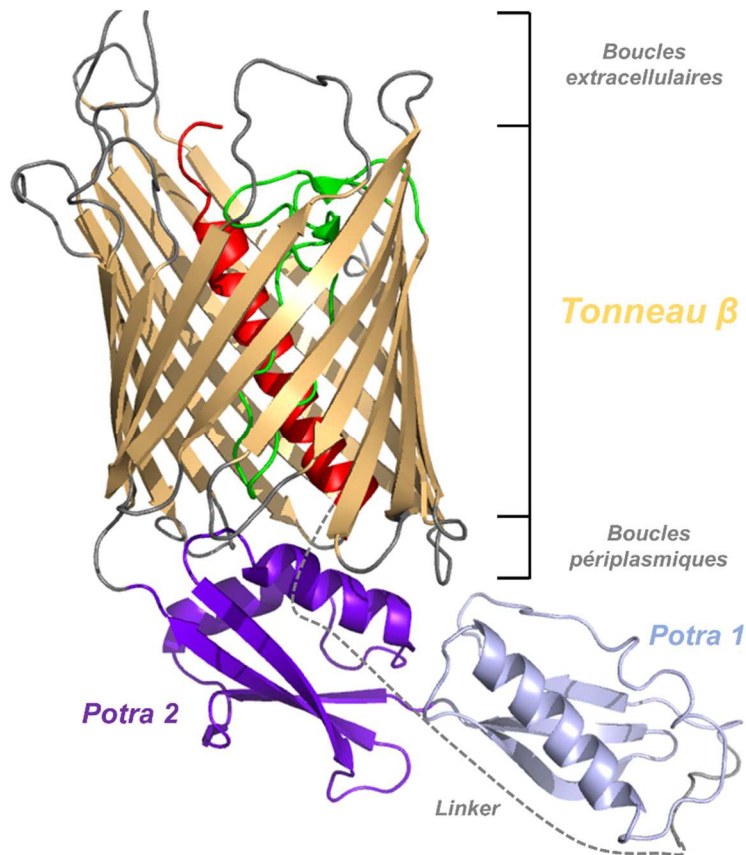
La partie C-terminale correspond au tonneau β , formé de 16 brins β antiparallèles (notés $\beta 1$ à $\beta 16$) qui sont reliés par de courtes boucles du côté périplasmique et des longues boucles extracellulaires (notés L1 à L8). Nous pouvons voir aussi que 2 éléments structuraux obstruent ce canal. Ainsi à l'intérieur du tonneau se trouve la boucle L6 qui est un élément conservé de la superfamille reliant les brins $\beta 12$ - $\beta 13$. Sur cette structure, L6 plonge à l'intérieur du canal jusqu'au périplasma. Le deuxième élément obstruant le canal correspond à l'hélice α appelée H1 (Fig. 19B). Cette dernière forme l'extrémité N-terminale de FhaC, elle est reliée aux domaines périplasmiques par une région d'environ 30 acides aminés riches en

proline que l'on nomme aussi « linker » (Fig. 19A). Ce linker n'a toutefois pas pu être résolu dans la structure de FhaC.

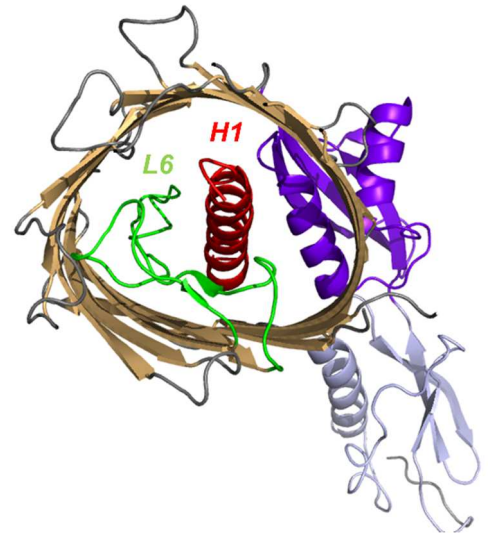
Dans cette conformation, avec la présence de ces 2 éléments structuraux, le diamètre du pore est estimé à environ 3 Å (Fig. 19C). Cette constriction rend impossible le passage de la FHA à l'intérieur du canal. Si nous supprimons la présence de l'hélice H1 et/ou la boucle L6 *in silico*, le diamètre du pore calculé serait de l'ordre de 8 Å pour la délétion d'un des 2 éléments, à 16 Å si les 2 sont retirés. Autrement dit, des tailles qui sont plus en accord avec le passage de la FHA.

La partie N-terminale de FhaC qui commence donc par l'hélice α H1 est reliée par le linker à 2 domaines périplasmiques POTRA (Polypeptide Transport Associated). Comme pour tous les TpsB, ces domaines périplasmiques sont au nombre de 2 (notés Potra1 et Potra2) avec un repliement de type : $\beta\alpha\alpha\beta\beta$, sauf que pour le domaine Potra1 la première hélice α est remplacée par une boucle comportant seulement un tour d'hélice (Fig. 19A). Dans cette structure nous pouvons observer que 2 hélices des Potra1 et 2 (H2 et H4 respectivement) sont alignées et orientées vers la lumière du canal et que le Potra2 possède un feuillet β formé de 2 grands brins β ($\beta 5$ et $\beta 6$) qui sont eux aussi orientés vers l'intérieur du canal. Ce domaine Potra est en connexion avec le tonneau β par plusieurs résidus dans des boucles périplasmiques qui forment des ponts H avec des résidus dans les hélices H3 et H4 (Fig. 19D). Le Potra1 est en position distale par rapport au tonneau, il est relié au domaine Potra2 par une charnière de 4 acides aminés (EWGR) qui semble importante puisqu'une insertion dans cette dernière empêche la sécrétion de la FHA. Les domaines Potra1 et Potra2 sont aussi connectés par des ponts hydrogène entre leurs extrémités en vis-à-vis.

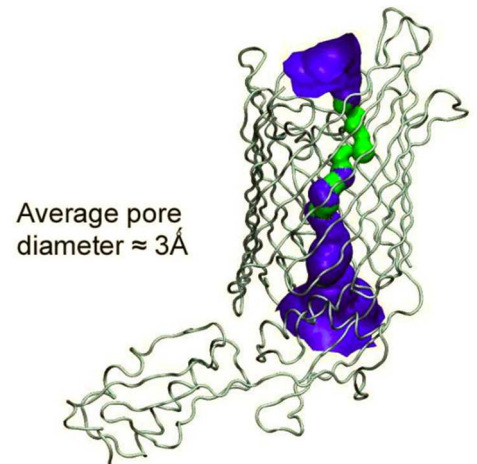
A



B



C



D

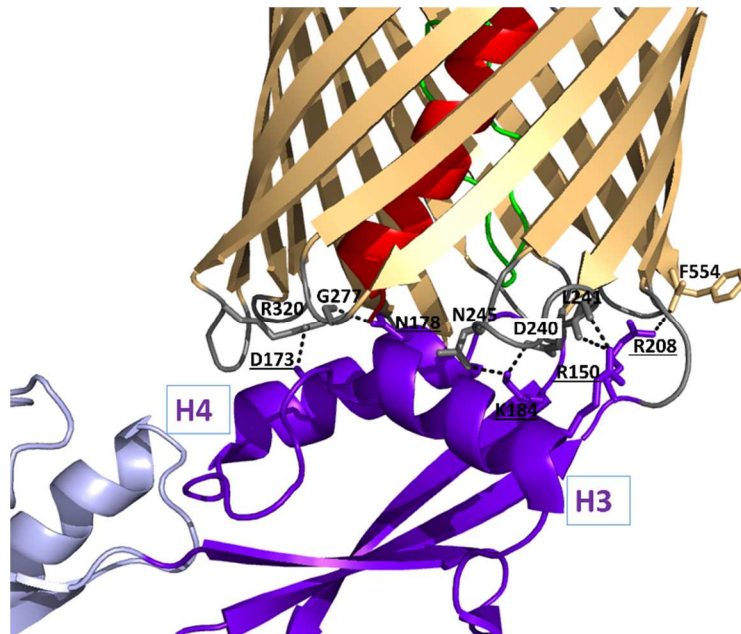


Figure 19: Représentation du transporteur FhaC de *B. pertussis*. A, Structure cristallographique de FhaC. Le tonneau β membranaire est représenté en orange. Le domaine péripasmique Potra 2 (violet) est le plus proche du tonneau et en interaction tertiaire avec certains résidus des boucles péripasmiques. L'hélice α N-terminale H1 (rouge) à l'intérieur du tonneau est reliée au Potra 1 (cyan) par le Linker, non résolu dans la structure cristallographique (en pointillé). B, Vue extracellulaire de FhaC. L'intérieur du tonneau est obstrué par 2 éléments structuraux : l'hélice H1 (rouge) et la boucle L6 (vert). C, Représentation et estimation *in silico* du diamètre du pore de FhaC. La zone de constriction est représentée en vert (Clantin et al., 2007). D, Représentation des résidus (soulignés) des hélices H3 et H4 du Potra2 en interaction avec des résidus présents dans les boucles péripasmiques. L'acide aminé (code à une lettre) et le numéro du résidu sont indiqués.

Fonctions des domaines POTRA :

Ces domaines sont indispensables pour la sécrétion de la FHA. Ils permettent la reconnaissance périplasmique du domaine TPS de la FHA. Des comparaisons de séquences entre les domaines POTRA de différents TpsB montrent que les résidus plus conservés sont pour la plupart des résidus hydrophobes orientés vers le cœur du domaine et servant donc à la structure du POTRA. Les résidus plus accessibles depuis la surface ne sont quant à eux que peu voire pas conservés, ce qui permettrait une certaine spécificité de reconnaissance du TpsA associé (Delattre et al., 2011). La technique de résonance plasmonique de surface réalisée sur ces domaines utilisés comme analytes en présence du domaine TPS de la FHA immobilisé a permis de caractériser l'importance de certains résidus pour la reconnaissance. Ainsi le recrutement initial entre FHA et FhaC pourrait se faire par une attraction électrostatique grâce à un patch de résidus négatifs présent sur le Potra1. Puis la FHA transiterait vers le canal par la reconnaissance de sites importants présents dans le $\beta 2$ et H2 du Potra1 ainsi que dans le sillon hydrophobe formé par H4 et $\beta 5$ du Potra2. Les sites présents dans le Potra2 auraient un rôle très important puisque deux substitutions situées dans H4 (V169T+I176N) suffisent pour empêcher la reconnaissance et la sécrétion. Aucun phénotype aussi prononcé n'a pu être observé dans le Potra1 même après plusieurs remplacements d'acide aminés. Au vu de la structure de FHA, des POTRA de FhaC, et de manière plus générale du domaine TPS des TpsA et des Potra des TpsB, cette interaction pourrait se faire par β augmentation, c'est à dire par l'interaction entre un/des brin(s) β de la FHA et le bord des feuillet(s) β du Potra1 et surtout du Potra2. Cette interaction se ferait alors par la formation de ponts hydrogène entre les chaînes principales du TpsA et du TpsB, alors que la spécificité serait amenée par la nature des interactions entre des chaînes latérales. Ainsi par exemple dans le cas de FhaC, le sillon hydrophobe formé par l'hélice H4 et le brin $\beta 5$ du Potra2 pourrait interagir avec les chaînes latérales hydrophobes des brins β amphipathiques de FHA.

Les différences structurales entre FhaC (TpsB) et BamA (Omp85) :

Du point de vue de leurs séquences et aussi de leurs structures, les protéines de type BamA ne possèdent pas d'extension N-terminale composée d'une Hélice α et d'un linker précédant leurs domaines POTRA. Leur structure commence donc par des domaines POTRA, qui sont plus nombreux chez les protéines de BamA que ceux des transporteurs TpsB. D'autres part, le Potra2 de FhaC est positionné d'une façon intermédiaire si on compare sa position à celle des domaines Potra5 de *N. gonorrhoeae* et *H. ducreyi*. En effet, le Potra2 de FhaC est plus proche de la conformation décrite comme ouverte du Potra5 de *H. ducreyi*, mais à l'instar de celui de *N. gonorrhoeae*, il est stabilisé dans cette conformation par des liaisons H (Fig. 19D). Dans le milieu extérieur, les boucles extracellulaires dans les 2 structures de BamA disponibles forment un dôme au-dessus de la lumière du canal qui aurait alors pour rôle de limiter la diffusion des solutés à travers la membrane. En revanche, les boucles extracellulaires de FhaC sont en conformation plus ouverte (Fig. 19A). Pour FhaC comme pour BamA, la fonction de ces boucles extracellulaires reste encore inconnue. Par exemple dans le cas de BamA, lors de l'insertion d'un autotransporteur dans la membrane

externe, il a été proposé que le domaine passager transite aussi à travers le tonneau de BamA. Dans ce cas, il serait nécessaire d'imaginer une ouverture de ce dôme lié à un changement de conformation des boucles extracellulaires. Quant à FhaC, la forme étendue des boucles pourrait être directement liée à sa fonction de translocation. Dans cette conformation, les boucles extracellulaires faciliteraient le passage du TpsA. Puisque dans cette structure les boucles ne forment pas un dôme, on peut alors imaginer que la diffusion de solutés du périplasme vers l'extérieur -ou de l'extérieur vers le périplasme- serait limitée par la présence de H1 dans la structure de FhaC (voir partie résultats).

Une autre grande différence est la place de la boucle L6, très conservée dans la superfamille et portant le motif VRGF/Y dont l'importance fonctionnelle a été évoquée plus haut. Dans la structure de BamA, nous pouvons voir que cette boucle est partiellement à l'intérieur du canal et stabilisée par des interactions avec des chaînes latérales de résidus pointant vers l'intérieur du pore et appartenant aux brins β 13- β 16. Dans la structure de FhaC, L6 traverse toute la longueur de pore, et son extrémité avec le motif VRGY atteint le périplasme (Fig. 19A). Dans cette structure, la boucle n'est pas en interaction avec des résidus à l'intérieur du canal. Elle n'est aussi que peu définie dans la carte de densité électronique, ce qui empêche de placer correctement les chaînes latérales de ses acides aminés, et elle a donc été construite comme une chaîne poly-alanine.

Très récemment, au cours de ma dernière année de thèse, nous avons été amenés à revoir notre structure de FhaC. Sébastien Hiller et Timm Maier qui ont cristallisé la structure d'un autre membre de la superfamille Omp85 (Gruss et al., 2013), ont pu comparer leur jeu de données avec celui de FhaC établi en 2007 (Clantin et al., 2007). Ils se sont alors rendu compte qu'à l'époque le manque de résolution de L6 avait conduit à une erreur. Notre collaborateur et cristallographe, Bernard Clantin a ainsi pu la corriger et publiera très prochainement une structure corrigée de FhaC (Fig. 20). Dans cette nouvelle structure de FhaC nous pouvons voir que la boucle L6 ne traverse plus l'intégralité du canal (Fig. 20B, C). Comme pour BamA, cette boucle ne rentre que partiellement puis est stabilisée dans cette conformation par des interactions avec des résidus présents à l'intérieur du canal (motif GxDxG, voir partie résultats). Ainsi nous le verrons par la suite, cette structure corrigée n'a modifié en rien les conclusions apportées dans notre article basé sur l'ancienne structure (Guérin et al., 2014). Toutefois elle nous a permis de mieux comprendre certains résultats supplémentaires (voir partie résultats).

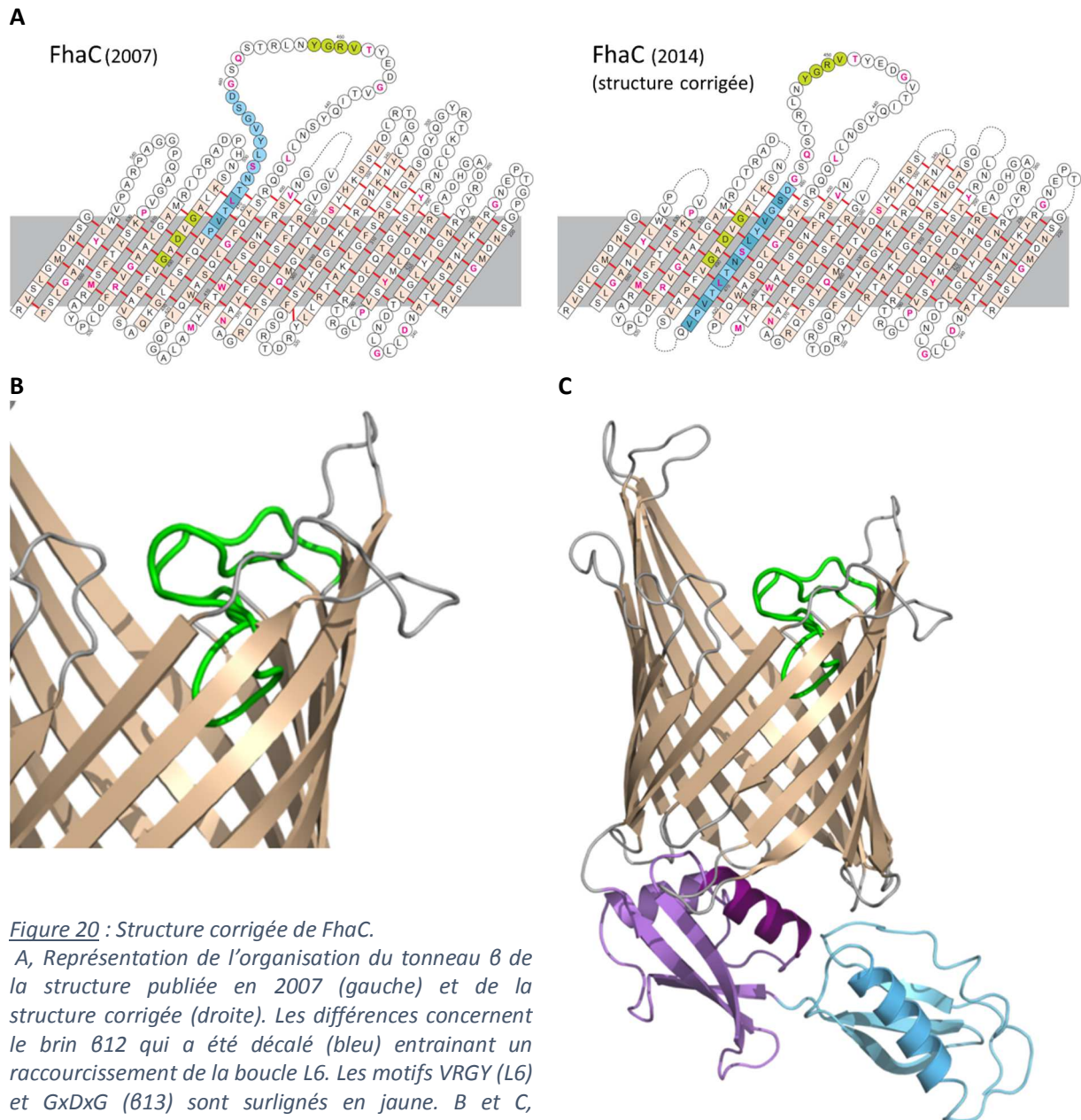


Figure 20 : Structure corrigée de FhaC.

A, Représentation de l'organisation du tonneau β de la structure publiée en 2007 (gauche) et de la structure corrigée (droite). Les différences concernent le brin $\beta 12$ qui a été décalé (bleu) entraînant un raccourcissement de la boucle L6. Les motifs VRGY (L6) et GxDxG ($\beta 13$) sont surlignés en jaune. B et C, Représentation de la boucle L6 (vert) corrigée dans la structure cristallographique. L'hélice H1 n'est pas affichée dans le pore pour plus de visibilité.

➤ *Conclusion sur la sécrétion à 2 partenaires (TPS) :*

Pourquoi avoir regroupé les ATs et les TPS ? A l'origine, cette classification se basait sur l'analyse des séquences N-terminales des autotransporteurs et des protéines de type TpsA. Dans ces deux familles de protéines, certains membres possèdent un long peptide signal de plus de 40 acides aminés contenant des résidus aromatiques et hydrophobes conservés. Il s'agit de l'extension N-terminale dont nous avons parlé plus haut. De plus, d'un point de vue fonctionnel, les TpsA et les domaines passagers des autotransporteurs sont de larges facteurs de virulence sécrétés, essentiellement structurés en hélice β , avec diverses fonctions, en particulier l'adhésion. D'un point de vue structural, les protéines permettant la sécrétion par la membrane externe, étaient prédites pour être des tonneaux β , bien qu'à

l'époque les TpsB étaient prédits pour avoir 19 brins β (au lieu de 16) (Guédin et al., 2000) et le domaine β des autotransporteurs pour en avoir 14 (au lieu de 12). Il est supposé que les autotransporteurs sont apparus avant les « unlinked autotransporteurs », comme les systèmes TPS étaient appelés, puisque ces derniers montrent une organisation du tonneau β plus complexe que celui des autotransporteurs (Henderson et al., 2000).

Actuellement, et à la lumière de nos connaissances, nous nous apercevons que les raisons pour lesquelles il a été convenu de rassembler les ATs et les TPS sont quelques peu erronées. Toutefois alors que le type V de sécrétion pouvait s'apparenter à un « fourre-tout », la découverte en 2003 que l'insertion et la sécrétion des ATs dépendent d'une protéine de la superfamille Omp85 pourrait unifier tous les membres compris dans ce type de sécrétion. Ainsi la sécrétion des autotransporteurs et des TpsA dépendent toutes les deux de protéines homologues, composées d'un tonneau β de 16 brins portant un motif sur une boucle très conservée et des domaines Potra périplasmiques. Ainsi l'étude mécanistique de la sécrétion d'un des 2 systèmes (Autotransporteur/Omp85 ; TpsA/TpsB) pourrait nous en apprendre aussi sur l'autre système.

b) T5dSS, un mélange entre les systèmes autotransporteurs et TPS

Encore très peu étudiée, la protéine la plus décrite du type de sécrétion 5d est PlpD (patatin-like protein) de *Pseudomonas aeruginosa* (Salacha et al., 2010). Sa fonction n'a pas encore été caractérisée, mais elle porte un motif Patatine qui est retrouvé dans des protéines de plantes pour le stockage en tubercules avec une fonction d'hydrolase.

Comme pour les autotransporteurs classiques, cette protéine possède 2 domaines : un domaine passager N-terminal portant la fonction et un domaine transmembranaire C-terminal. Toutefois ce dernier ne possède aucune similarité de séquence au tonneau à 12 brins β des autotransporteurs. En effet son domaine transmembranaire est plus proche de celui des systèmes à deux partenaires (type 5b) et donc des transporteurs Omp85. Son tonneau possède 16 brins β prédits avec des motifs de séquence retrouvés dans la superfamille. Ce canal se rapproche de celui que j'ai étudié durant ma thèse, avec la différence notable que le domaine sécrété est directement fusionné au reste de la protéine et serait libéré dans le milieu extérieur par un système de clivage encore inconnu. Toutefois, de manière très intéressante, nous pouvons aussi observer que ce type de protéine possède entre le domaine passager et le domaine transmembranaire un à deux domaines Potra prédits (Salacha et al., 2010 ; Jacob-Dubuisson et al., 2013). En général, les domaines Potra sont décrits comme des domaines de reconnaissance protéine-protéine (Kim et al., 2007 ; Delattre et al., 2011), il est donc intéressant de se poser la question sur la nécessité d'avoir conservé ces domaines pour le type 5d de sécrétion, puisque comme les autotransporteurs classiques le domaine passager est fusionné au reste de la protéine. On pourrait alors supposer que les domaines POTRA jouent un rôle fonctionnel dans le mécanisme de sécrétion. Par exemple, une étape de fixation sur les POTRA pourrait permettre une bonne orientation du domaine passager avant sa translocation. Cette fixation pourrait par ailleurs,

à l'instar des chaperonnes, empêcher le domaine passager d'avoir une structuration prématurée dans le périplasme (Grijpstra et al., 2013).

En dehors de cet exemple, l'analyse de banques de séquences génomiques a révélé l'existence d'autres gènes codant des protéines ayant un domaine transmembranaire de type 5b fusionné avec une grande région N-terminale. Chez des cyanobactéries, ces régions peuvent contenir un domaine TPS qui est retrouvé dans les protéines de type TpsA, ce qui correspondrait à une fusion TpsA-TpsB (Arnold et al., 2010 ; Jacob-Dubuisson et al., 2013). Toutefois il ne s'agit ici que des analyses de séquences, et aucune étude n'a pour l'instant montré que ces protéines étaient produites et retrouvées dans les membranes externes. Le type 5d de sécrétion ne se limiterait donc pas juste aux protéines homologues à PlpD, mais pourrait comprendre toutes les protéines qui possèdent un domaine passager fusionné à un TpsB.

De plus amples informations sur les systèmes TPS sont disponibles en annexe de cette thèse. Il s'agit d'un article de revue que nous avons rédigé durant mon doctorat avec Françoise Jacob-Dubuisson et notre collaborateur cristallographe Bernard Clantin aidé de son étudiante Stéphanie Baelen (**Annexe 1 : Two-partner secretion : as simple as it sounds ?**).

III. Résonance Paramagnétique Electronique appliquée aux protéines

La Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) est une technique de spectroscopie magnétique qui permet d'étudier des espèces contenant des centres paramagnétiques, autrement dit qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés leur conférant un spin électronique non nul. Cette technique est utilisée dans de nombreuses disciplines (chimie du solide, géologie, pétrologie, datation, biochimie, imagerie médicale...). Elle permet d'étudier des échantillons sous forme de poudre, de cristaux, ou en solution dans une large gamme de températures pouvant atteindre quelques milli Kelvin.

Non désireux de vouloir faire une liste exhaustive de toutes les techniques existant en RPE pour étudier le monde qui nous entoure (il me faudrait plus de la durée d'une thèse pour maîtriser toutes ces techniques...), nous nous intéresserons ici, à l'utilisation de la RPE appliquée à l'étude dynamique et conformationnelle des protéines. Pour être étudiées, ces protéines doivent donc posséder un centre paramagnétique qui peut être un radical ou un métal de transition (par exemple des métallo-protéines). Dans le cas où ces centres ne sont pas présents de manière naturelle, il est possible de greffer une sonde radicalaire sur une protéine par la technique dite du marquage de spin (SDSL : Site-Directed Spin Labeling).

1. Marquage de spin (Site-Directed Spin Labeling)

Ces sondes radicalaires, que l'on appelle aussi sondes paramagnétiques, sont en général stables dans le temps et possèdent un groupement fonctionnalisé leur permettant de réagir spécifiquement à une fonction chimique. Durant ma thèse, j'ai utilisé l'une des sondes les plus couramment employées : (1-Oxyl-2,2,5,5-tetraméthyl- Δ^3 -pyrroline-3-méthyl) Méthanethiosulfonate, que l'on nomme MTSL (Fig. 21). Cette sonde possède un électron libre lui conférant sa propriété paramagnétique avec un groupement lui permettant de réagir avec la fonction thiol des chaînes latérales des cystéines de façon covalente. Pour les protéines comme FhaC, ne possédant aucune cystéine endogène, cette technique (SDSL) est très puissante car à l'aide de la biologie moléculaire, il est possible d'insérer une unique cystéine à un endroit précis dans la chaîne polypeptidique et d'y greffer cette sonde.

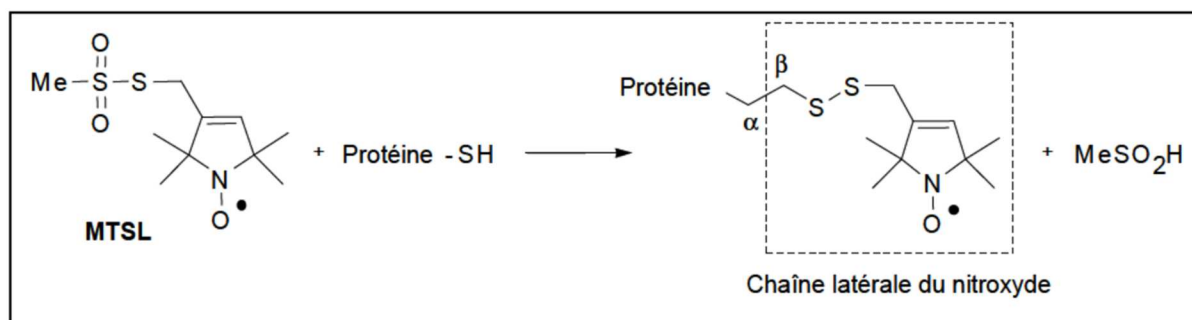


Figure 21 : schéma de fixation par liaison covalente du MTSL avec la chaîne latérale d'une cystéine présente sur une protéine et libération d'un acide méthyl sulfinique.

Le marquage par le MTSL est donc plutôt simple du fait de sa spécificité. De plus, à la différence d'autres marqueurs que l'on peut trouver en biologie (anticorps, GFP, sonde fluorescente...), son encombrement stérique est relativement faible (l'équivalent d'un tryptophane) et donc a pour conséquence de peu perturber la structure de la protéine. Ce type de marquage peut être applicable à de très nombreux types de protéines : structurées ou non, solubles ou solubilisées en détergent, voire même réincorporées dans des membranes lipidiques (voir partie résultats). Cette étape de marquage est très importante puisqu'elle va déterminer la qualité de l'information que l'on pourra extraire de la RPE. Ainsi la position de la cystéine dans la structure tridimensionnelle est primordiale, puisqu'elle définira la quantité de protéines marquées. Par exemple, une cystéine située dans un site très enfoui de la protéine sera en général moins accessible au MTSL qu'un site exposé. Ce site pourra toutefois être marqué, mais il sera alors nécessaire de faire varier certaines conditions du protocole de SDSL (temps de marquage, température...) (Bordignon, 2012) (voir partie résultats).

2. De la propriété magnétique du MTSL jusqu'au spectre RPE

a) Principe physique

Comme dit précédemment, le MTSL est un radical, et à ce titre un centre paramagnétique qui est caractérisé par 2 interactions magnétiques lors d'une expérience de RPE.

La première de ces interactions est appelée l'interaction de Zeeman. Elle est induite lorsque nos échantillons sont placés dans un champ magnétique B_0 . L'électron (dont la valeur du spin $S = 1/2$) va alors, à la manière d'un barreau aimanté, s'aligner selon l'axe de ce champ B_0 , générant 2 populations, parallèle et antiparallèle à ce champ magnétique. Ces populations correspondent à 2 états énergétiques différents (de valeur $M_s = -1/2$ ou $+1/2$ respectivement). Ils sont alors séparés par un écart d'énergie (ΔE) qui est proportionnel à l'amplitude du champ appliqué (Fig. 22).

La seconde interaction dénommée l'interaction Hyperfine, il s'agit d'une interaction entre le spin électronique et un spin nucléaire non nul d'un noyau. Dans le cas de la molécule MTSL, il s'agit d'un atome d'azote ^{14}N portant la fonction radicalaire $-\text{NO}^\bullet$.

Ce spin nucléaire (valeur $I = 1$) possède 3 états énergétiques différents (de valeur $M_I = -1, 0, +1$) qui vont interagir avec le spin électronique.

Ceci revient à dire que chaque niveau énergétique du spin électronique ($M_s = -1/2$; $M_s = +1/2$) est subdivisé en 3 niveaux liés à la présence du spin nucléaire voisin.

Dans une expérience de RPE, en plus du champ magnétique, nous appliquons à notre échantillon une onde électromagnétique d'une fréquence $\nu \approx 9,5$ Ghz. Cette énergie est alors absorbée pour une valeur égale à ΔE , c'est la condition de résonance ($\Delta E = h\nu$; avec $\Delta M_s = \pm 1$ et $\Delta M_I = 0$: règle de sélection). Dans le cas de l'interaction hyperfine, l'éclatement des niveaux d'énergie lié au couplage électron/noyau crée 3 transitions possibles, et donc la

condition de résonance est vérifiée pour 3 valeurs. Nous détecterons donc 3 raies d'absorption égales (Fig. 22).

Pour des raisons techniques, nous détectons en fait sur les spectres RPE la première dérivée de l'absorption. Par ailleurs, sur un spectre RPE, nous pouvons voir en abscisse des valeurs de champ magnétique (Gauss ou milliTesla). Pour détecter les conditions de résonance qui sont très proches les unes des autres, il est plus facile de travailler à fréquence constante et de faire varier le champ magnétique jusqu'à arriver aux 3 conditions de résonance.

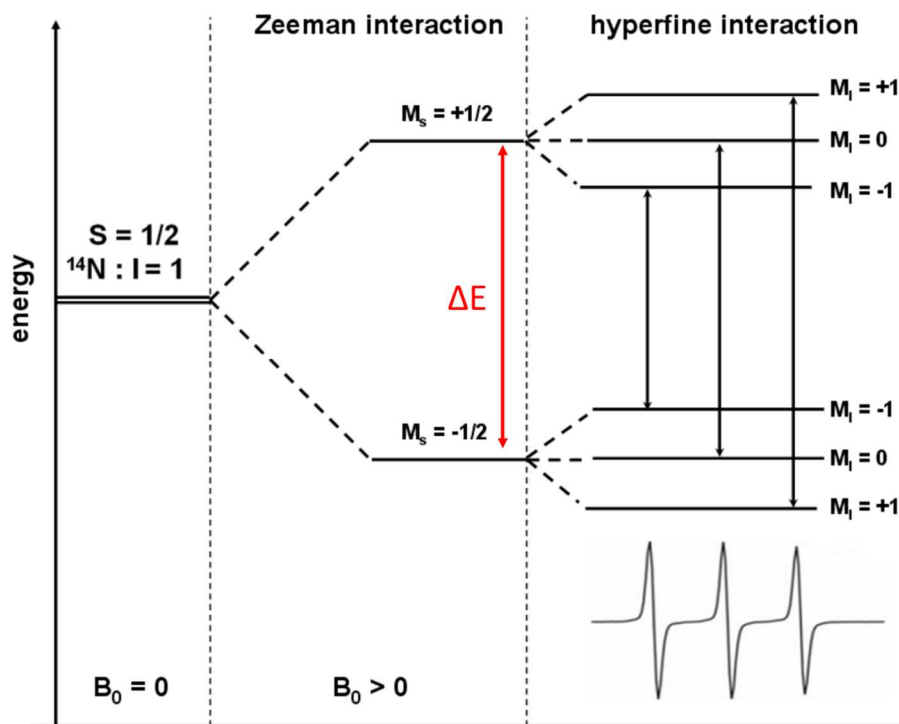


Figure 22 : Diagramme des niveaux d'énergie pour un système de spin $S = 1/2$ et $I = 1$. L'interaction entre le spin électronique ($S=1/2$) et le champ magnétique extérieur ($B_0 > 0$) (Interaction Zeeman) entraîne une séparation en 2 niveaux énergétiques différents ($M_s = \pm 1/2$) caractérisée par un écart énergétique (ΔE). L'interaction entre le spin électronique et le spin nucléaire ($I = 1$) (Interaction Hyperfine) divise chaque état énergétique en 3 sous-états ($M_i = \pm 1$ ou 0). Les flèches noires indiquant les 3 transitions possibles, avec en-dessous un spectre RPE qui correspond à la dérivée de l'absorption lors de l'application d'une onde électromagnétique.

b) Un peu de calcul...

Pour l'interaction de Zeeman, la transition entre les 2 valeurs énergétiques M_s correspond à :

$$\Delta E = h\nu = g\beta B_0$$

Constantes :

h , constance de Planck
 β , le magnéton de Bohr électronique

Propriétés de l'expérience :

ν , fréquence de l'onde
 B_0 , valeur du champ magnétique externe

Propriété du système :

g , facteur de Landé, qui vaut 2,0023 pour un électron seul
 (grandeur physique sans dimension gouvernée par la structure électronique du centre paramagnétique)

Or, dans la molécule de MTSL, l'électron subit une interaction hyperfine liée à la proximité de l'atome d'azote. Ainsi la condition de résonance n'est réalisée que lorsque l'écart d'énergie entre deux niveaux équivaut à l'énergie du rayonnement électromagnétique (selon les règles de sélection $\Delta M_s = \pm 1$ et $\Delta M_I = 0$).

$$\Delta E = h\nu = g\beta B_0 + AM_I$$

Propriétés du système : M_I , valeur de spin nucléaire
A, couplage hyperfin

Comme expliqué précédemment, puisque $M_I = -1, 0, +1$, les conditions de résonance sont vérifiées pour 3 valeurs différentes du champ magnétique qui correspondent alors à un champ magnétique résonant B_{MI} que nous pouvons définir dans notre équation comme :

$$B_{MI} = \frac{(h\nu - AM_I)}{g\beta}$$

en remplaçant par les valeurs de M_I :

$$B_{MI+1} = (h\nu - A) / g\beta$$

$$B_{MI0} = h\nu / g\beta$$

$$B_{MI-1} = (h\nu + A) / g\beta$$

Le spectre ainsi obtenu est composé de 3 raies équidistantes (B_{MI+1} , B_{MI0} , B_{MI-1}) séparées par une valeur définie par $A/g\beta$ dont le centre correspond à la raie B_{MI0} sur laquelle on peut extraire la valeur de g (Fig. 23).

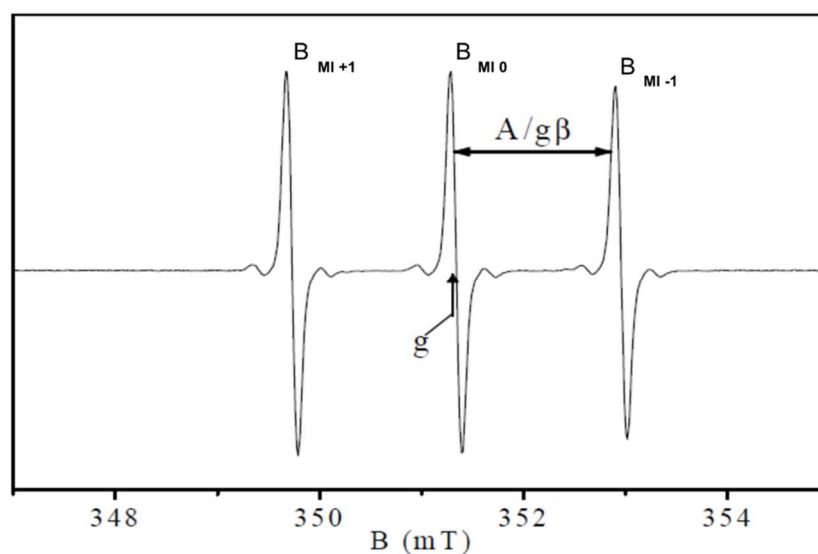


Figure 23 : Dérivée première du spectre d'absorption correspondant à un centre isotrope spin $S= 1/2$ et $I= 1$. Chaque raie est séparée de la même valeur $A/g\beta$. La valeur du champ magnétique en B_{MI0} permet de déterminer la valeur de g .

Toutefois il s'agit d'un calcul simplifié, qui n'est applicable en RPE que dans le cas de systèmes isotrope pour lesquels toutes les interactions sont moyennées et donc toutes les directions de l'espace sont équivalentes pour l'électron. Dans un tel système g et A n'ont chacun qu'une seule valeur propre en tout point du système. Le MTSL, et plus communément un radical nitroxyde, correspondent à un centre anisotrope dû à cette interaction dipolaire entre noyau et électron, dans un espace déterminé par un axe $N-O^\bullet$ (que l'on définira comme l'axe X). Dans ce cas, la réponse du système dépend de la direction de la perturbation, et les valeurs du couplage hyperfin A et du facteur g deviendront alors des grandeurs tensorielles. Pour une molécule de MTSL, les valeurs propres de ces tenseurs sont donc inégales puisque le couplage spin-orbite avec l'atome d'azote va provoquer une plus grande différence du facteur g selon l'axe X ($N-O^\bullet$) que selon la direction orthogonale à ce plan (l'axe Z).

Dans une expérience de RPE avec du MTSL, nous aurons donc :

$$\boxed{g_z < g_y < g_x} \quad \text{et} \quad \boxed{A_x \approx A_y < A_z}$$

(Symétrie axiale)

Cette anisotropie des valeurs propres des tenseurs g et A va refléter la mobilité du MTSL que l'on détectera par un spectre RPE. Ainsi lorsque la molécule de MTSL peut se déplacer rapidement et de manière isotrope, toutes les interactions magnétiques sont moyennées se caractérisant par :

$$\boxed{g = \frac{(g_x + g_y + g_z)}{3}} \quad \text{et} \quad \boxed{A = \frac{(A_x + A_y + A_z)}{3}}$$

Les valeurs de g et A ainsi moyennées sont représentées par 3 raies étroites et équidistantes (donc presque similaires à un centre magnétique isotrope (Fig. 23)), ce qui traduit des valeurs des champs résonants ($B_{MI +1}$, $B_{MI 0}$, $B_{MI -1}$) bien définis séparés par A . Expérimentalement ces spectres sont caractéristiques du MTSL libre en solution à température ambiante.

En revanche, quand la mobilité du MTSL est très contrainte, lors par exemple d'une fixation à une cystéine sur un site enfoui, ou en solution gelée, la valeur des champs résonants ($B_{MI +1}$, $B_{MI 0}$, $B_{MI -1}$) n'est plus moyennée mais couvre une large gamme (Fig. 24). Cette gamme est définie essentiellement par l'anisotropie du tenseur A où : $A_x \approx A_y \ll A_z$; cette différence est d'autant plus marquée que le ralentissement de la sonde est grand. Cette anisotropie conduit à des raies spectrales pour $B_{MI +1}$ et $B_{MI -1}$, qui s'éloignent de la raie centrale avec une distance $2A_{zz}$ qui augmente (Fig. 24B). Elle traduit la distance en champ que l'on peut mesurer directement sur un spectre RPE, et qui correspond à la distance entre les A_z de la raie $B_{MI +1}$ et $B_{MI -1}$. Lors de ralentissement du MTSL, la raie centrale peut aussi s'élargir. Mais n'étant pas affectée par le couplage hyperfin ($B_{MI 0} = h\nu / g\beta$), cet élargissement rend compte

uniquement de l'anisotropie du tenseur g (Fig. 24D). Comme pour $2A_{zz}$, cet élargissement est mesurable directement sur un spectre RPE, et nous verrons par la suite que ces 2 valeurs sont utilisables pour rendre compte de la mobilité du nitroxyde (Fig. 25) (J.N.Junk, 2012).

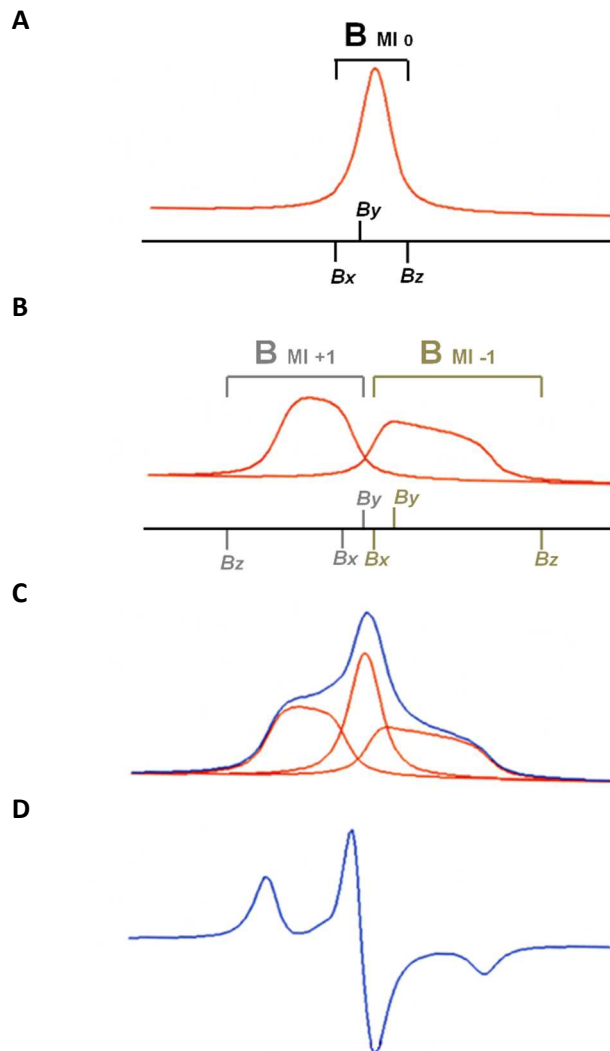


Figure 24 : Spectres RPE de MTSL en solution gelée. A, B, Spectres d'absorption correspondant aux trois plages de champ résonant ($B_{ML} \pm 1$ et 0) avec pour chacune les valeurs B_x B_y B_z définissant la largeur de ces plages pendant laquelle il y a absorption de l'onde électromagnétique. C, Superposition des 3 plages de champ. Le trait bleu correspond au spectre d'absorption total. D, dérivée première du spectre d'absorption.

c) Analyse de spectre RPE

Comme nous venons de voir, la forme des spectres RPE donne une information sur la mobilité du MTSL. Ainsi quand cette sonde paramagnétique est greffée sur la cystéine d'une protéine, sa mobilité s'en voit affectée par différents facteurs : le mouvement global de la protéine et les mouvements locaux (fluctuations de la chaîne polypeptidique, dynamique de la chaîne latérale de la cystéine), et les contraintes stériques liées à la présence d'acides aminés voisins et aux contacts tertiaires. Cette mobilité qui dépend de ces différents facteurs, peut être définie par le temps de corrélation de rotation de la sonde noté τ_c (Fig. 25). Ce dernier est à la fois composé du temps de corrélation local lié à la position de la sonde de spin et du temps de corrélation rotationnelle de la protéine sur elle-même. Toutefois, dans le cas de protéines de plus de 50 kDa (comme FhaC) ce facteur est négligeable dans la mesure du τ_c , puisque le temps rotationnel du polypeptide devient alors

trop lent comparé à celui du MTSL. Ainsi dans la suite de cette thèse, nous prendrons le τ_c comme une valeur rendant compte des mouvements locaux. Il est d'ailleurs d'usage dans la littérature d'augmenter la viscosité du milieu (ex : sucrose) pour les protéines de petite taille, afin de diminuer l'influence du mouvement global en augmentant le temps de corrélation rotationnelle de la protéine.

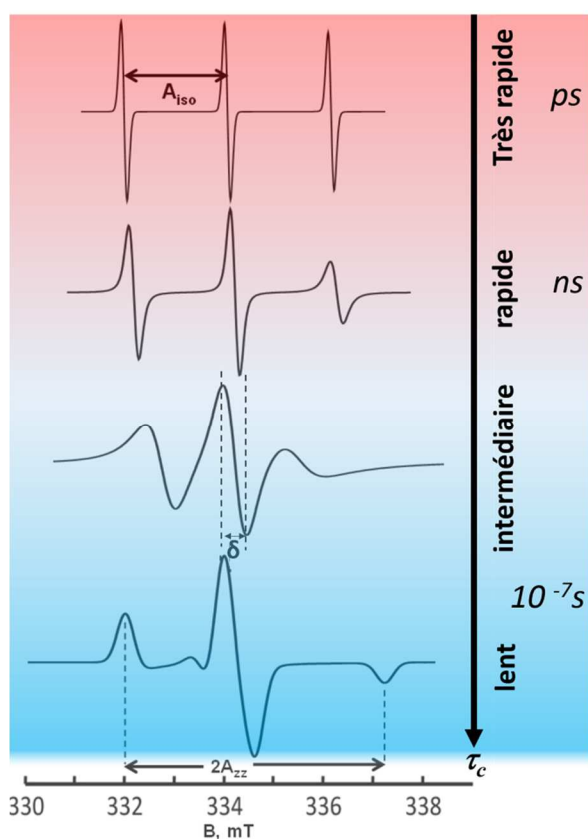


Figure 25 : Ensemble de spectres RPE d'un radical nitroxyde en fonction de la mobilité caractérisée par le temps de corrélation τ_c . Ce dernier représente le temps moyen pendant lequel le mouvement de rotation du radical est prévisible. Il est d'autant plus petit que le mouvement aléatoire du radical est rapide et se visualise par l'allure du spectre définissant ainsi des plages de mobilités (très rapide à lent). Outre l'allure spectrale, des valeurs telles que la largeur de raie centrale (δ) et la distance $2A_{zz}$ sont utilisables pour caractériser la mobilité du radical.

Ainsi, la sonde paramagnétique libre en solution correspond à une mobilité très rapide de type isotrope avec un temps de corrélation de l'ordre de 10^{-12} s (Fig. 25). Quand cette sonde est greffée sur une cystéine, sa mobilité diminuera en fonction des paramètres locaux présents. On peut ainsi définir différents régimes de mobilité. Une mobilité rapide correspond à un temps de corrélation proche de 10^{-9} s, pour la sonde placée en des positions accessibles de la protéine dans des régions qui ne possèdent pas forcément de structure secondaire (donc plutôt de type boucle). En revanche si la cystéine est au sein d'une structure secondaire, et/ou la chaîne polypeptidique est en interaction avec d'autres résidus, la mobilité sera de type intermédiaire avec un temps de corrélation entre 10^{-9} s et 10^{-8} s. L'effet de moyenne des tenseurs A et g est de moins en moins efficace, ce qui conduit à un élargissement des raies du spectre. On observe l'anisotropie de ces tenseurs pour des mobilités encore plus lentes, proches de 10^{-6} s. Ce type de spectre est caractéristique du

MTSL greffé sur une cystéine présente dans un site enfoui, et/ou en forte interaction tertiaire. Comme vu précédemment, ce type de spectre est aussi observé en solution gelée (Fig. 24D et Fig. 25).

Comme nous venons de voir, le temps de corrélation est un bon moyen de rendre compte et de quantifier la mobilité de la sonde de spin en une position. La détermination de celui-ci est toutefois plus complexe car elle passe essentiellement par la simulation du spectre expérimental. Un des programmes les plus couramment utilisé est Easyspin, une boîte à outils qui s'implémente sur l'environnement de développement MatLab® (Stoll and Schweiger, 2006). La simulation reprend donc les conditions expérimentales en faisant varier certains paramètres (dont le τ_c) jusqu'à avoir un spectre simulé superposable au spectre expérimental (voir partie résultats). Il s'agit d'un outil très puissant qui demande toutefois une certaine prise en main avec quelques bases de programmation.

Toutefois, comme nous l'avons vu précédemment il existe des méthodes plus directes pour comparer plusieurs spectres RPE entre eux. Ainsi sur un spectre, nous pouvons utiliser la mesure de la valeur du couplage $2A_{zz}$ ainsi que la largeur de la raie centrale (Fig. 25). Cette dernière est très intéressante, car en la mesurant sur chaque spectre d'une protéine, elle permet de définir une mobilité normalisée, qui correspond à un paramètre semi-quantitatif décrivant ainsi la mobilité de la sonde entre la position la plus lente et la plus rapide enregistrée. Elle permet par ailleurs de comparer différentes conditions, comme l'ajout d'un substrat par exemple.

$$Ms = \frac{\delta^{-1} - \delta_{\text{slow}}^{-1}}{\delta_{\text{fast}}^{-1} - \delta_{\text{slow}}^{-1}}$$

Sur spectre expérimental:

δ largeur de la raie centrale du spectre expérimental

δ_{slow} et δ_{fast} largeurs de la raie centrale pour les positions où la sonde a la mobilité la plus lente et la plus rapide de la protéine étudiée.

Un autre paramètre semi-quantitatif est utilisable, il correspond au rapport des amplitudes pic à pic des 3 raies. Ainsi pour un set de spectres, il est possible de comparer les rapports des amplitudes entre la première raie (notée h_{+1})(ou dernière, h_{-1}) et de la raie centrale (h_0). Toutefois ce paramètre est moins évident à utiliser pour comparer toutes les mobilités des positions d'une protéine ayant des régimes rapides et lents de mobilité.

Enfin, un calcul qui reprend tous ces paramètres peut aussi être utilisé. Il exprime lui aussi un temps de corrélation qui n'est pas exactement le même que celui simulé. Toutefois il peut être très pratique pour comparer un grand nombre de positions entre elles. Il s'agit du temps de corrélation issue de l'équation de Kivelson (Wang et al., 1998).

$$\tau_c = (6.6 \times 10^{-10}) \delta \left[\left(\frac{h_0}{h_{-1}} \right)^{1/2} + \left(\frac{h_0}{h_{+1}} \right)^{1/2} - 2 \right]$$

Sur spectre expérimental:

h_0 : distance pic à pic de la hauteur de la raie centrale

h_{+1} : distance pic à pic de la hauteur de la première raie

h_{-1} : distance pic à pic de la hauteur de la dernière raie

δ : largeur pic à pic de la raie centrale

3. Quelques exemples...

Dans la littérature, de nombreux articles permettent d'établir le lien entre la forme spectrale et la mobilité du MTSL en fonction de sa localisation dans la structure tridimensionnelle d'une protéine. Les pionniers furent toutefois les chercheurs de l'équipe de McHaourab, qui en 1996 ont établi une carte de mobilité du lysozyme T4 en fonction de la position du MTSL dans la protéine en comparant pour chaque spectre l'inverse de la largeur de la raie centrale (ΔH_0 , aussi nommée δ précédemment) et l'inverse du second moment du spectre ($\langle H^2 \rangle$) reflétant les anisotropies des tenseurs g et A (Fig. 26) (Mchaourab et al., 1996).

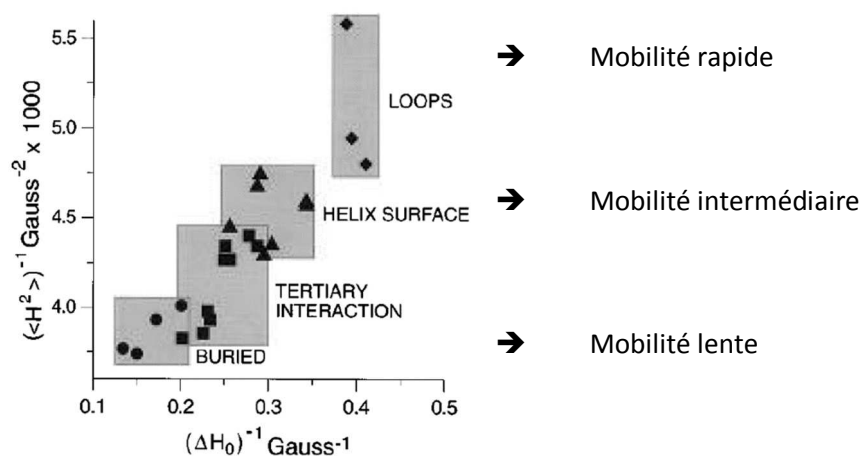


Figure 26 : Diagramme représentant le lien entre la largeur de raie centrale (ΔH_0) et le second moment du spectre ($\langle H^2 \rangle$) en fonction de l'emplacement de l'élément structural sur lequel est greffée la molécule de MTSL. Ces valeurs sont tirées de spectres expérimentaux réalisés sur le lysozyme T4 (Mchaourab et al., 1996).

Ces premières caractérisations ont permis d'ouvrir la voie à de nombreuses études utilisant la RPE pour étudier les régimes de fonctionnement des protéines. Cette technique est très puissante pour étudier les protéines membranaires, qui sont souvent de grande taille et difficilement purifiées en grande quantité. Outre les études dynamiques d'une chaîne polypeptidique, la RPE permet aussi de sonder et détecter les changements de conformation de celle-ci. C'est par exemple le cas de BtuB, le transporteur de la vitamine B₁₂, présent dans la membrane externe d'*E. coli*. L'équipe de David Cafiso a montré que cette protéine en forme de tonneau β possède un domaine (TonB-box) capable de subir un changement conformationnel (Fig. 27) (Lukasik et al., 2007). Ainsi en insérant une cystéine sur ce domaine et en y greffant une molécule de MTSL (V10-R1, R1 représente le MTSL greffé sur la cystéine), ils se sont rendu compte que la mobilité de ce domaine était composite. C'est-à-dire que pour une même position (V10), 2 composantes sont présentes et définies par 2 mobilités différentes : l'une immobile très majoritaire et l'autre mobile (s et f, respectivement), qui correspondent à 2 conformations différentes (Fig. 27A). L'ajout de la vitamine B₁₂ provoque un changement spectral, dans lequel la composante rapide est plus représentée. Ceci traduit un changement de conformation, dans lequel le domaine TonB-box devient mobile. Ils ont ainsi caractérisé ces 2 conformations, la composante lente correspond au domaine TonB-box en interaction à l'intérieur du tonneau β . Il s'agit d'une interaction tertiaire électrostatique entre le résidu Arg14 présent sur ce domaine et le résidu Asp316 présent à l'intérieur du tonneau (Fig. 27A). La composante rapide traduit un état dans lequel ce domaine n'est plus en interaction tertiaire, il est dans le périplasma : le MTSL est alors moins entravé dans sa mobilité. Cette conformation est fortement représentée lorsque cette liaison R14-D316 est rompue génétiquement, ou lorsque la vitamine B₁₂ est ajoutée. Lors de sa fixation à l'intérieur du tonneau β , la vitamine B₁₂ doit donc entraîner un éloignement des 2 résidus qui ne sont alors plus en interaction, le domaine TonB-box n'est donc plus maintenu à l'intérieur du tonneau et se retrouve dans le périplasma (Fig. 27B) (Lukasik et al., 2007).

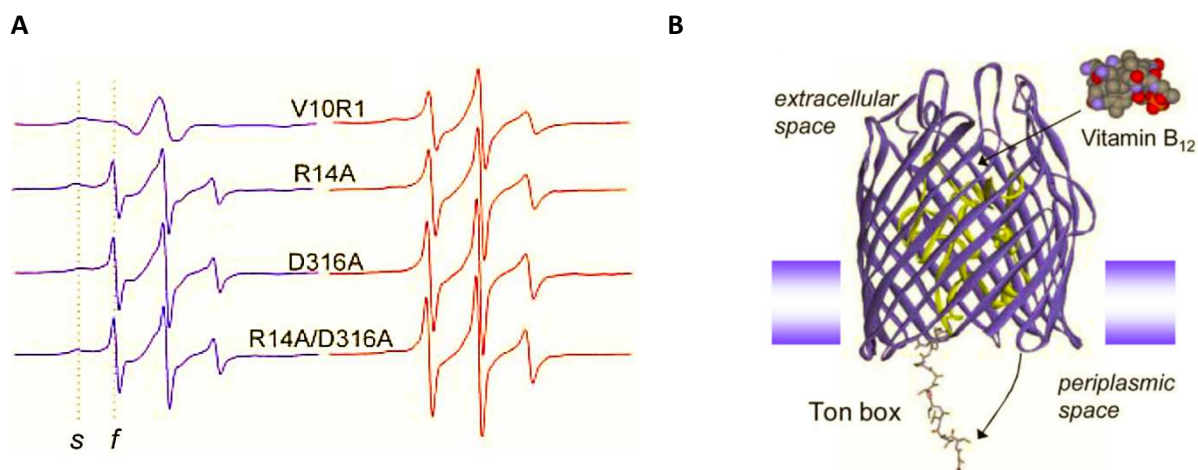


Figure 27 : Analyse conformationnelle de la Ton box de BtuB. A, Spectres RPE expérimentaux de BtuB qui possède du MTSL fixée sur une cystéine en position 10 sur la région Ton box. Cette même position a été analysée dans divers contextes, avec des mutations (R14A et/ou D316A), et en présence du substrat de BtuB (Vitamine B₁₂) : spectres rouges. Les lignes pointillées correspondent à 2 composantes spectrales, l'une de faible mobilité (s) et l'autre plus rapide (f). B, structure cristallographique de BtuB, et représentation du changement conformationnel de la Ton box en présence de la vitamine B₁₂ (Lukasik et al., 2007).

4. La RPE en mode impulsif

Il s'agit d'une technique complémentaire à l'étude de la mobilité de la sonde paramagnétique. L'une des techniques en RPE impulsif permet de mesurer des distances comprises entre 1,5 nm et 8 nm entre deux espèces paramagnétiques par refocalisation de l'interaction dipolaire entre les deux sondes. Appliquée à FhaC, nous avons mis en œuvre un double marquage de la protéine (Fig. 28A). Pour cela nous utilisons donc des mutants de FhaC portant 2 cystéines sur des positions préalablement identifiées comme possédant une bonne accessibilité au MTSL afin d'optimiser la quantité de protéine doublement marquée. Cette technique nous permet d'avoir des informations sur la structure de FhaC en membrane lipidique, et sur la modification de cette structure lors d'un changement conformationnel (en présence du substrat, par exemple).

Lors d'une expérience de RPE impulsif, l'échantillon est congelé à environ 60 Kelvin grâce à l'utilisation d'une cryogénie à l'hélium liquide. Cet échantillon reçoit alors une séquence d'impulsions d'intensité et de durée bien déterminées. Dans notre cas, et en général pour l'étude structurale des protéines par RPE, il s'agit d'une séquence à 4 impulsions nommée DEER (Double Electron-Electron Resonance) (Fig. 28B). Ces impulsions vont permettre d'irradier de façon sélective les deux populations de spins A et B présents dans notre échantillon afin d'isoler uniquement la valeur du couplage dipolaire (interaction spin-spin) des autres contributions vues précédemment (anisotropie du tenseur g, couplage hyperfin). Pour cela, les populations sont manipulées indépendamment l'une de l'autre. Ainsi, la population A est excitée à une fréquence ν_{obs} que l'on observe par un écho de spin (=écho de Hahn) qui va alors refocaliser toutes les interactions, y compris l'interaction dipolaire (Fig. 28C). Cette interaction sera alors détectée par l'utilisation d'une impulsion d'inversion de fréquence ν_{pompe} qui a pour rôle d'exciter la population B (Fig. 28C). La résonance des spins de la population B impactera alors la population A en modifiant le champ magnétique local du spin A et donc en induisant une modulation de l'amplitude de l'écho de spin à la fréquence angulaire du couplage dipolaire (Fig. 28D).

Ainsi dans une expérience de double résonance en RPE impulsif nous détectons cette modulation de l'écho de spin (Fig. 28E). L'existence d'une décroissance périodique indique une interaction dipolaire entre les 2 spins électroniques. La mesure de la période nous permet de définir la distance r , séparant les 2 molécules de MTSL.

Les données sont alors traitées mathématiquement en représentant cette décroissance d'amplitude sous la forme du « doublet de Pake » duquel l'on peut déduire ν_{\perp} , qui sera utilisée pour calculer la valeur de r . Le traitement des données aboutissant au calcul de la distance entre les 2 sondes est réalisé grâce à une transformée de Fourier, complétée de la régularisation de Tikhonov (cette régularisation permet de résoudre des problèmes qui ne sont pas bien posés et d'en obtenir une solution numérique). Le traitement finalisé nous permettra de représenter ces données obtenues sous la forme d'une distribution de distances (Fig. 28E).

$$r = \sqrt[3]{\frac{52,04}{\nu_{\perp}}}$$

calcul simplifié (issu de l'équation utilisée pour calculer la fréquence angulaire) et uniquement adapté à des radicaux de type nitroxyde (valeur du tenseur g_A et g_B équivalent à g_e)
 r en nanomètre

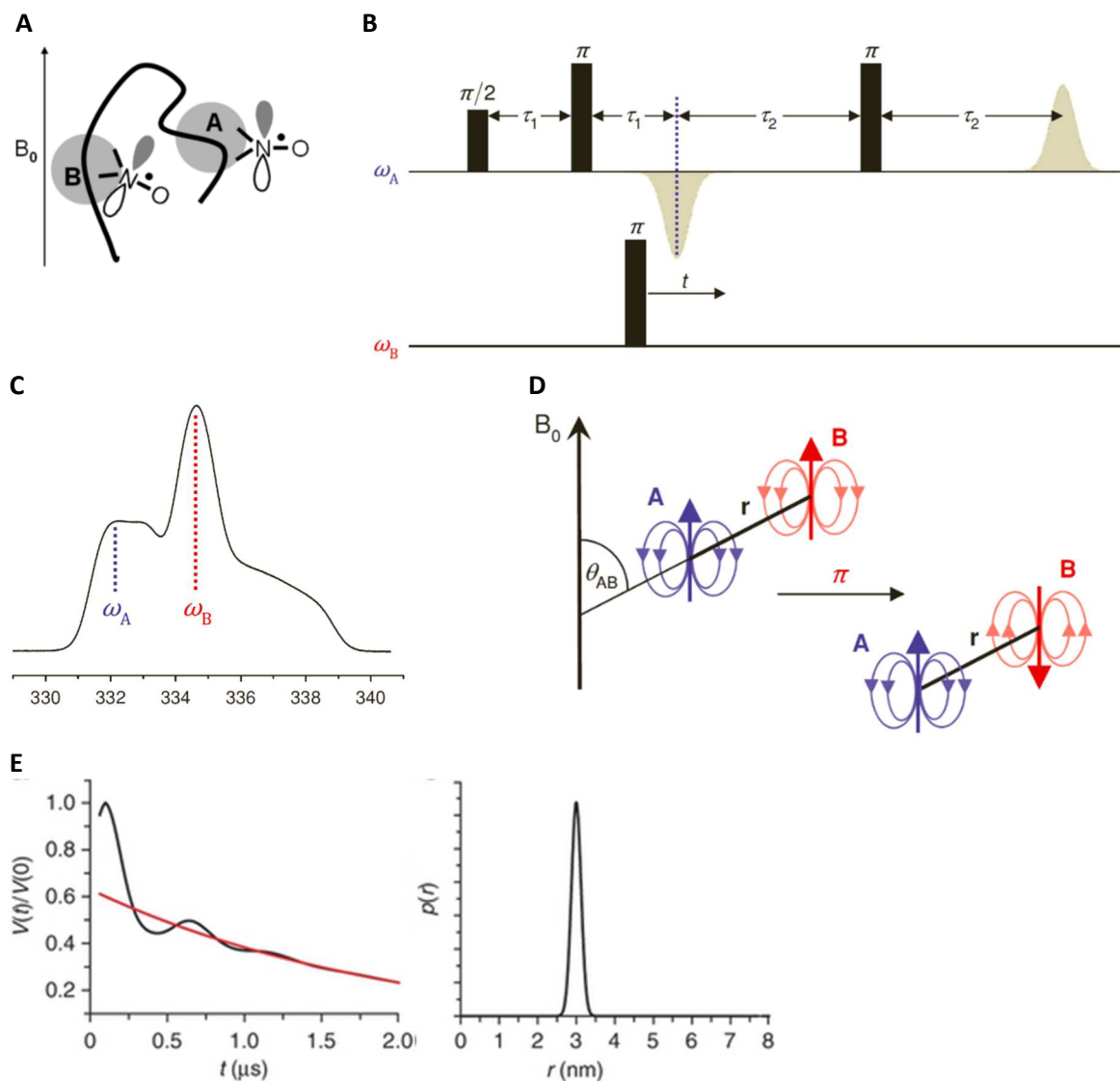


Figure 28 : Principe de RPE impulsienne sur protéine doublement marquée au MTSL. A, représentation d'une protéine possédant 2 molécules de MTSL A et B. B, séquence DEER de 4 impulsions utilisées séquentiellement. C, spectre d'absorption du MTSL montrant les fréquences de résonance (ν_{obs}) et (ν_{pump}) utilisées pour exciter les populations de spin A et B respectivement. D, illustration de chaque spin électronique des populations A et B par rapport au champ magnétique (B_0) et séparées par une distance r . L'impulsion π effectuée sur la population B, entraîne une modification de son orientation par rapport au champ magnétique. E, évolution temporelle de l'écho de Hahn modulé par l'interaction dipolaire (gauche). Après traitement du signal, la distance inter-spin est représentée sous la forme d'un diagramme de distribution de distances. (Azarkh et al., 2012 ; J.N.Junk, 2012 ; Hashemi Shabestari, 2013)

En raison de la flexibilité des chaînes polypeptidiques et à la liberté conformationnelle du MTSL, la distance dipolaire n'est jamais réellement très précisément définie. Il s'agit pour la plupart des cas, d'une large distribution de distances centrée autour d'une valeur. Par ailleurs, il peut exister une variété de rotamères des deux molécules de MTSL en fonction de leurs positions dans la protéine, ce qui peut se traduire par la mesure de plusieurs distances dipolaires différentes. Toutefois l'utilisation conjointe d'une bibliothèque de rotamères avec la structure cristallographique d'une protéine permet de réaliser des prédictions numériques des valeurs de ces rotamères (voir partie résultats).

Un autre facteur important pour l'obtention de distance en RPE pulsée est le temps de relaxation transverse (T_m). D'un point de vue expérimental, ce facteur influence la distance maximum que l'on pourra extraire de l'évolution dipolaire. Plus la relaxation du nitroxyde sera rapide, moins il sera possible de voir des distances longues. Et de manière générale, ce temps de relaxation est très court pour les protéines membranaires (environ 1 μ s), et FhaC ne déroge malheureusement pas à la règle. La relaxation est inhérente au système étudiée, bien qu'il soit possible expérimentalement de légèrement l'améliorer en utilisant un tampon deutéré. Les faibles concentrations habituellement disponibles lors de la purification des protéines membranaires et l'encombrement moléculaire dans la bicouche membranaire peuvent ainsi conduire à une décroissance très rapide qui peut nuire à l'analyse des données mesurées par la séquence DEER, spécifiquement pour les longues distances. Ainsi les expériences sur ce type de protéine, sont assez coûteuses en termes de temps de mesure et de consommation d'hélium pour refroidir l'échantillon. Typiquement l'acquisition d'un spectre avec un bon rapport signal sur bruit sur des protéines membranaires peut exiger 12 à 24 h d'accumulation (Bordignon, 2012).

Objectifs

Etude de la dynamique conformationnelle de FhaC, le transporteur membranaire de l'hémagglutinine filamenteuse de Bordetella pertussis

La voie de sécrétion à deux partenaires (TPS) est utilisée pour le transport de protéines de grande taille (TpsA) à travers la membrane externe. Cette sécrétion est réalisée par des transporteurs spécifiques (TpsB) qui partagent une origine commune avec d'autres transporteurs ubiquitaires que l'on regroupe dans la superfamille Omp85. Tous ces transporteurs possèdent la même organisation structurale : un tonneau β à 16 brins, des motifs très conservés et des domaines POTRA extra-membranaires.

De nombreux TpsA ont été identifiés comme des facteurs de virulence importants dans la pathogénicité bactérienne. Depuis plusieurs années, le couple FHA/FhaC représente un modèle d'étude pour cette voie de sécrétion. Ainsi l'étude du transporteur FhaC suscite 2 intérêts, l'un étant de comprendre son mécanisme de fonctionnement dans la sécrétion de la FHA. Puisque tous les TpsB possèdent une organisation structurale identique, nous pourrions extrapoler nos résultats aux autres systèmes TPS. L'autre intérêt de ce système est de caractériser la fonction des motifs et des éléments structuraux qui sont communs dans la superfamille Omp85. Puisque ces derniers ont été conservés au cours de l'évolution, nous pouvons supposer qu'il existe des mécanismes moléculaires communs dans la superfamille. Découvrir la fonction de ces éléments dans FhaC pourrait ainsi permettre de progresser dans la compréhension des transporteurs Omp85.

Ma thèse s'intègre dans un projet dirigé par Françoise Jacob-Dubuisson réunissant 4 équipes financées par l'Agence Nationale de la Recherche. Le but du projet est de décrypter la voie de sécrétion à 2 partenaires et plus particulièrement d'en comprendre son aspect dynamique en utilisant le couple FHA/FhaC comme modèle. Ainsi les objectifs majeurs sont de comprendre la dynamique conformationnelle de FhaC au cours d'un cycle de sécrétion et d'élucider le chemin de translocation de la FHA (Fig. 29).

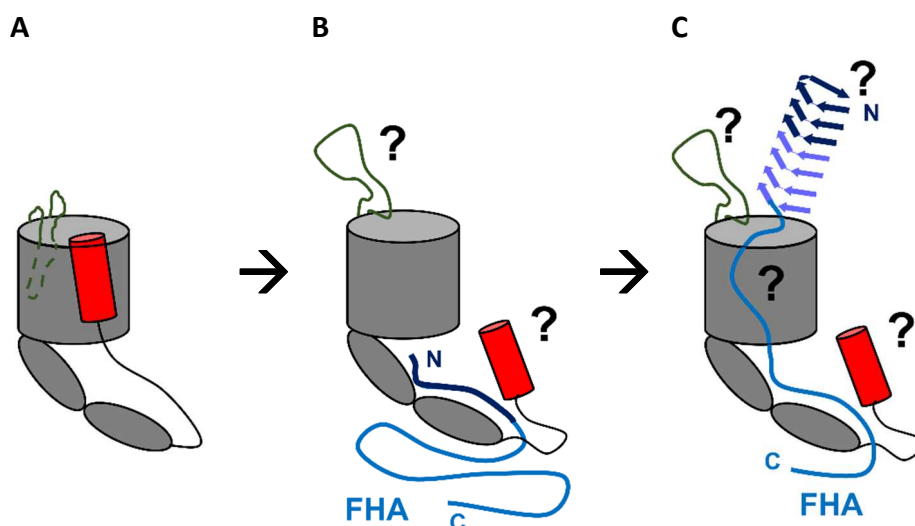


Figure 29 : Représentation d'un cycle de sécrétion de la voie TPS. A, Etat au repos de FhaC basé sur la structure cristallographique. L'hélice H1 (rouge) et la boucle L6 (vert) sont à l'intérieur du pore. B, Complexe initial lors de la reconnaissance entre le domaine TPS (bleu foncé) de la FHA (bleue) avec les domaines POTRA de FhaC. Des changements de conformation de l'hélice et/ou de la boucle L6 sont imaginés permettant l'ouverture du pore (point d'interrogation). C, Complexe en action lors de la translocation de la FHA à travers le pore qui se structure progressivement en hélice β à la sortie du pore. La conformation de FhaC, le chemin de la FHA à travers le pore et l'initiation du repliement par le domaine TPS ne sont pas connus (points d'interrogation). N et C correspondent respectivement au N terminus et au C terminus de la FHA.

Objectif du travail de thèse :

Mon objectif a été d'étudier la dynamique conformationnelle de FhaC et de détecter ses changements de conformations en présence de la FHA. La structure cristallographique a révélé que le pore de FhaC était obstrué par deux éléments : l'hélice α N-terminale (H1) et la boucle L6. Nous supposons que cette conformation correspond à la forme de FhaC au repos (Fig. 29A), mais dans nos modèles de sécrétion nous devons imaginer la sortie d'au moins un de ces éléments pour permettre l'ouverture du canal et le passage de la FHA à travers le pore (Fig. 29B). Afin de détecter un tel changement de conformation, nous déterminons la mobilité de la chaîne polypeptidique des différents éléments structuraux de FhaC (Hélice H1, Linker, boucle L6, boucles extracellulaires, domaines POTRA..) en utilisant la technique de marquage de spin (SDSL) couplée à la technique de Résonance paramagnétique électronique en onde continue. Au cours de ma thèse nous avons initialement mis au point cette technique sur FhaC purifiée en détergent, cependant nous verrons par la suite que nous avons mis en œuvre une technique de reconstitution en membrane lipidique afin d'analyser la dynamique de FhaC dans un environnement plus naturel et pouvoir ainsi comparer sa conformation avec celle en détergent qui correspond à la forme cristallographique. Une fois les changements de conformation détectés, leurs déplacements pourront être mesurés par l'utilisation de la RPE impulsionnelle.

Dans le but de caractériser la fonction de certains résidus/motifs/éléments structuraux de la séquence polypeptidique de FhaC, des mutations de ces derniers ont été réalisées. L'importance fonctionnelle de ces résidus a été déterminée en caractérisant les effets des mutations introduites par plusieurs techniques (test de sécrétion *in vivo*, RPE, électrophysiologie...).

Ainsi durant ma thèse, j'ai eu cette chance très enrichissante de faire partie de 2 équipes de recherche possédant des thématiques et des approches très différentes. Ainsi au sein de l'équipe du Dr. Françoise Jacob-Dubuisson (directrice de thèse), j'ai réalisé toute la partie biologie/biochimie : expériences de biologie moléculaire, production et purification de protéine, marquage de spin, et reconstitution en membrane lipidique. Puis j'ai réalisé les expériences de RPE dans le laboratoire du Dr. Hervé Vezin (co-directeur de thèse) dans une équipe s'intéressant aux intermédiaires paramagnétiques dans les matériaux.

Enfin un dernier objectif, plus minoritaire de ma thèse, mais qui a été réalisé par notre équipe dans le programme ANR, a été de caractériser le passage de la FHA lors de la sécrétion (Fig. 29C). Une post-doctorante (Catherine Baud) a été recrutée pour réaliser ce travail. L'utilisation de 'cross-linkers' durant le cycle de sécrétion a ainsi permis d'établir le chemin de la FHA à l'intérieur du pore de FhaC. Mon travail ici a été principalement de la biologie moléculaire et la caractérisation de la topologie de la FHA en complexe bloqué dans le canal de FhaC (au départ par microscopie en fluorescence avec une ingénieure de l'équipe, Eve Willery, puis ensuite à l'aide de la cytométrie en flux avec Catherine Baud).

Résultats

Travaux préliminaires avant la publication

Durant ma thèse nous avons pu caractériser certains changements conformationnels de FhaC. L'utilisation en parallèle de techniques biochimiques et biophysiques, *in vivo* et *in vitro*, nous a permis de mettre en évidence la sortie de l'hélice H1 en dehors du pore. Une grande majorité de ces résultats utilisent l'insertion de cystéines dans la séquence de FhaC.

1. Création des mutants et test fonctionnel

Un travail préalable a été de muté le gène de FhaC afin d'y remplacer un codon préexistant par un codon « TGT » ou « TGC » de cystéine. Durant ma thèse, nous avons inséré plus d'une cinquantaine de cystéines dans différents sites de FhaC, et pour cela nous nous sommes aidés d'un kit de mutagenèse dirigée (QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies®). Le principe est plutôt simple, il consiste à utiliser une matrice c'est-à-dire un plasmide portant le gène *fhaC*, avec des amorces (oligonucléotides de 25-40 bases) qui correspondent à une partie de la séquence nucléotidique de *fhaC* portant un codon « TGT » ou « TGC ». C'est donc la spécificité des oligonucléotides qui va nous permettre d'insérer stratégiquement une cystéine à un site précis de FhaC (Domaines POTRA, boucles extracellulaires, Hélice H1 etc...). Une fois les brins d'ADN du plasmide dé-hybridés au cours d'une expérience de réaction en chaîne par polymérase (PCR), les amorces qui sont bien plus nombreuses vont statistiquement plus facilement pouvoir se ré-hybridiser avec les brins d'ADN du plasmide. Ainsi la polymérase va synthétiser un brin complémentaire qui possèdera alors la mutation portée par l'amorce. Une dernière étape consiste à séparer les brins d'ADN néo-synthétisés portant la mutation des brins parentaux correspondant à la matrice (sans mutation). Pour cela nous ajoutons une enzyme de restriction DpnI. Cette dernière reconnaît spécifiquement et digère les sites d'ADN méthylés. La matrice qui correspond à des plasmides extraits d'une souche bactérienne sont méthylés et seront ainsi clivés en fragments, alors que les brins néo-synthétisés portant la mutation ne sont pas méthylés. Après une étape de transformation bactérienne, nous contrôlons systématiquement par séquençage le gène *fhaC*, et nous vérifions qu'il porte bien la mutation désirée à l'endroit souhaité, et bien entendu, qu'il ne possède que cette mutation.

Afin d'éviter de compromettre et de nuire à la fonction de la protéine, dans la plupart des cas nous avons choisi des positions qui ont été testées dans le passé (Guedin, 2000 ; Delattre et al., 2010 ; Delattre et al., 2011) et/ou des substitutions de résidus exposés en surface et non conservés ayant vraisemblablement peu d'importance fonctionnelle ou structurale (alanine, sérine,...). L'insertion de cystéine en un grand nombre de positions possibles peut ainsi nous permettre de caractériser la dynamique conformationnelle de différents éléments structuraux de FhaC par la technique de RPE en onde continue (RPE-CW).

Dans le but de s'assurer que la fonction de FhaC ne soit pas altérée, toutes les mutations ont été testées quant à la capacité de sécrétion d'un substrat modèle par FhaC

(Fig. 30). Ce test consiste à déterminer le rapport entre la quantité d'un dérivé de la FHA retrouvé dans le milieu extracellulaire et la quantité de FhaC présente dans les membranes après avoir cultivé les souches portant les plasmides d'intérêt (celui codant le substrat et celui codant un variant de FhaC). Nous comparons ensuite ce rapport à la valeur obtenue pour un témoin positif qui ne contient pas de mutation dans FhaC. Comme dit dans l'introduction, ce test est réalisé chez *E. coli*, en utilisant des formes tronquées de la FHA, de 30 kDa, 60 kDa ou 80 kDa, toutes contenant bien entendu le domaine TPS N-terminal. Ce test nous permet ainsi de discriminer les mutations FhaC qui affectent très largement la sécrétion et donc de ne pas les utiliser pour le reste de notre analyse en RPE-CW.

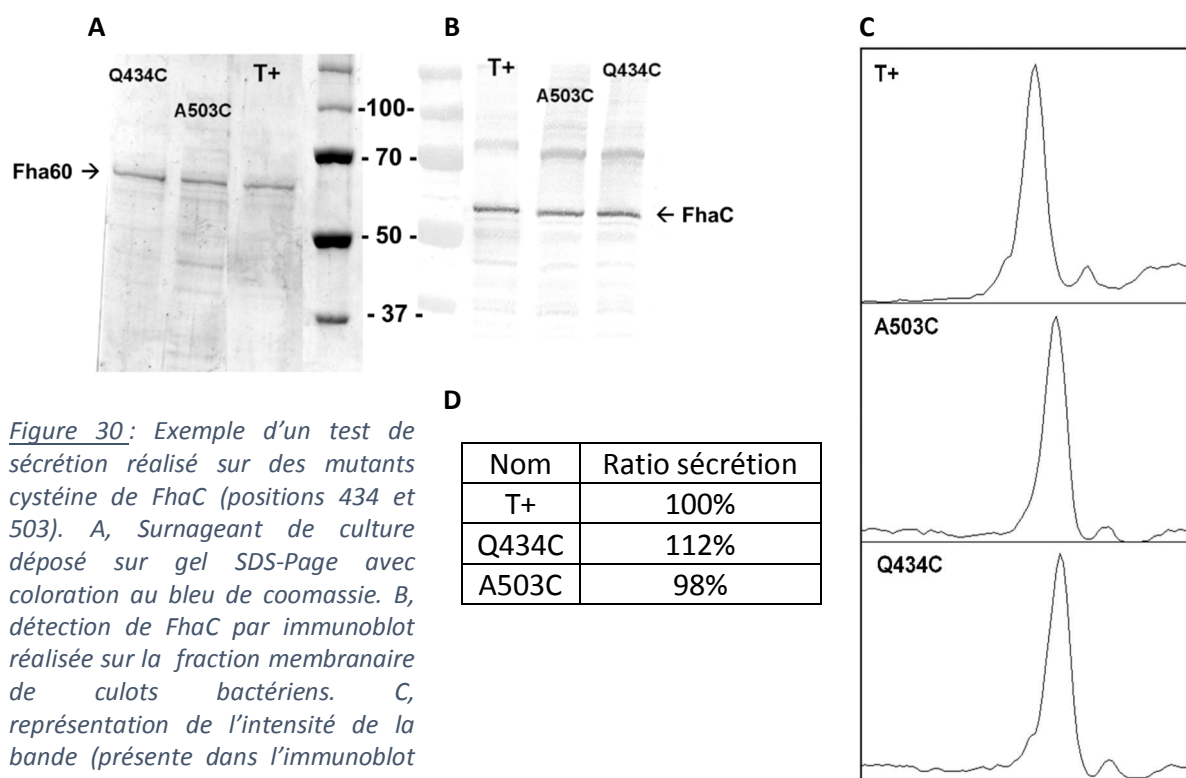


Figure 30: Exemple d'un test de sécrétion réalisé sur des mutants cystéine de FhaC (positions 434 et 503). A, Surnageant de culture déposé sur gel SDS-Page avec coloration au bleu de coomassie. B, détection de FhaC par immunoblot réalisée sur la fraction membranaire de culots bactériens. C, représentation de l'intensité de la bande (présente dans l'immunoblot montré en B) par utilisation de ImageJ®. D, Rapport d'intensité entre Fha60/FhaC pour FhaC sauvage (T+, mis à 100% arbitrairement) et pour des mutants FhaC.

2. Premières expériences de RPE

Chaque mutant FhaC est surproduit dans une souche spécifique d'*E. coli* qui produit moins de porines (BI21(DE3) *omp5*) et extrait de la membrane externe par l'utilisation d'un détergent non ionique non dénaturant, le n-Octyl- β -D-Glucopyranoside, le même qui a été utilisé pour la cristallisation en vue de la détermination de la structure de FhaC aux rayons X (Clantin et al., 2007). La protéine qui est alors soluble dans une micelle de détergent est ensuite purifiée par une chromatographie échangeuse d'ions, éluée avec un gradient de NaCl (FhaC s'élué vers 300 mM NaCl) et marquée avec la sonde paramagnétique MTSL. Comme dit dans la partie RPE de l'introduction, cette étape est très importante puisque la réussite d'une expérience de RPE va dépendre de la qualité et de la quantité de protéine

marquée. Sur une protéine membranaire, c'est d'autant plus important qu'en général la production n'est jamais très forte et la protéine peut être difficile à concentrer. Par exemple pour FhaC, sur 2 Litres de culture, nous purifions environ 3 mg de protéine. Une expérience classique de RPE-CW est très pratique puisqu'elle requiert un échantillon à 50-100 μM dans un volume de 30 μL (capillaire) à 200 μL (cellules en quartz). Pour cela nous avons dû mettre au point un protocole de marquage adapté à FhaC. La sonde est mise en contact à 10 excès molaire avec la totalité de la fraction de FhaC purifiée qui est en détergent dans du tampon phosphate. Le temps d'incubation dépend principalement de l'accessibilité de la sonde à la cystéine à marquer, toutefois nous avons établi expérimentalement à partir de FhaC sauvage (sans cystéine) qu'un marquage aspécifique commençait à être détecté en RPE au bout de 4 heures de marquage à température ambiante. Afin d'optimiser notre quantité de protéine doublement marquée lors d'expériences de RPE impulsionnelle, nous établissons un marquage de 8 heures à 14 heures sous agitation douce à 14°C. Nous enlevons ensuite l'excès de sonde grâce à une deuxième chromatographie échangeuse d'ions après avoir dilué notre échantillon 5 fois pour diminuer la concentration en NaCl issu de la première purification. Cette étape nous permet ainsi de fixer notre protéine sur la colonne et de faire passer une grande quantité de tampon phosphate (au moins 50 ml) afin de retirer la totalité de sonde paramagnétique non fixée de manière covalente. Nous concentrons ensuite notre échantillon grâce à un 'pulse' de 700 mM de NaCl qui permet d'éluer la majorité des molécules de FhaC fixées sur la colonne dans un volume d'environ 500 μL . Les quantités de FhaC purifiées sont alors compatibles pour l'analyse par RPE et la concentration protéique est déterminée par dosage colorimétrique à environ 60 μM .

Sur base de la structure de FhaC, nous avons donc sélectionné des positions où les cystéines introduites seraient exposées au solvant. Mais pour un grand nombre de ces positions, après la mise en contact avec le MTSL et voir enlevé l'excès de sonde, nous nous sommes aperçus que nous avions un signal très faible avec un marquage inférieur à 20%. Il est en effet possible de quantifier le marquage en connaissant la concentration en protéine et en la comparant à l'absorption d'une solution de référence de MTSL.

Nous avons alors demandé à un de nos collaborateurs, le Dr. Marc Lensink, de nous modéliser la micelle de détergent autour d'une protéine de FhaC. Par ultracentrifugation analytique, il a été déterminé qu'une protéine pouvait être recouverte d'environ 140 molécules de détergent. En combinant la diffraction de neutrons aux petits angles et la modélisation moléculaire il s'est avéré que la micelle était capable de s'organiser de différentes manières autour de FhaC (Fig. 31A) (Gabel et al., 2014). Ainsi pour un même échantillon, les molécules de détergent s'organiseraient principalement autour du tonneau β qui correspond à la partie hydrophobe membranaire de la protéine. Cependant, elles peuvent aussi recouvrir des parties extra tonneau β comme des boucles extracellulaires et les domaines POTRA périplasmiques. A la lumière de ces différents modèles, nous pouvons supposer que certaines positions prédites pour être accessibles au solvant, pourraient en fait être partiellement masquées par le détergent et donc très faiblement accessibles à la sonde MTSL. En augmentant le temps d'incubation avec la sonde ou la température, nous n'augmentons pas toujours la proportion de protéine marquée, ce qui peut aussi refléter l'hétérogénéité de la population.

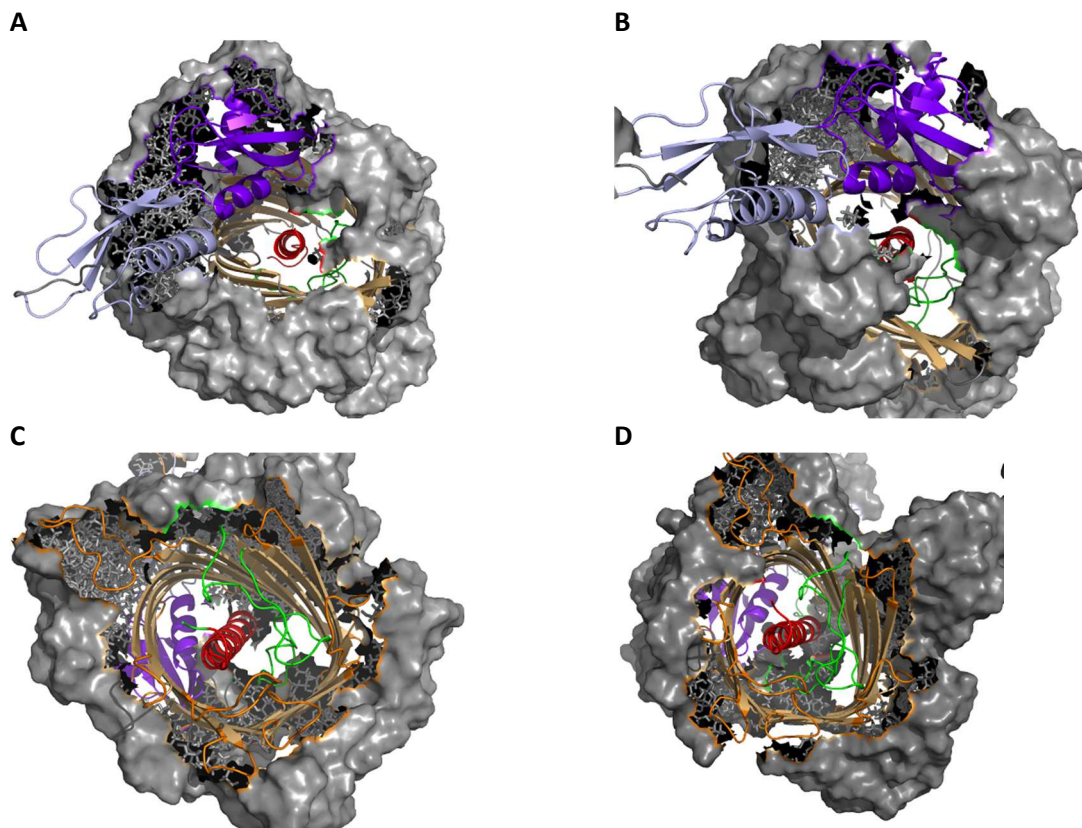


Figure 31A : 4 modèles différents de l'organisation de la micelle de détergent autour de la structure cristallographique de FhaC. Les molécules de détergent (représentées en surface grise) sont capables de s'organiser de manières différentes autour d'une même molécule de FhaC. A,B vue de dessous (périplasmique), nous pouvons voir que ces molécules peuvent recouvrir partiellement les domaines POTRA. C,D vue de dessus (extracellulaire), certaines boucles sont recouvertes du micelle de détergent.

Au cours de ma thèse, nous avons cherché plusieurs positions accessibles au MTSL pour avoir un bon marquage sur différentes régions de FhaC et pouvoir les combiner lors d'expériences de RPE impulsionnelle. Nous avons aussi mis au point un protocole pour reconstituer FhaC dans des petites vésicules membranaires unilamellaires (SUVs), dans le but d'étudier la mobilité et les changements de conformations de ces positions dans un contexte plus naturel qu'une micelle de détergent. Pour cela nous utilisons des lipides d'*E. coli* commerciaux (67% Phosphatidylethanolamine, 23,2% Phosphatidylglycerol et 9,8% Cardiolipin) que nous solubilisons dans du chloroforme (50mg dans 6ml) avant de l'évaporer sous flux d'argon et de resuspendre les lipides dans un tampon Tris-HCl pH 7,5 à 16 mg/ml. L'utilisation d'ultrasons (sonication en bain pendant 30 min (2x15min avec une pause de 10min), la solution devient alors plus translucide) va alors permettre aux lipides de se dissocier et de se réorganiser. Leur conformation finale en vésicules unilamellaires leur est alors donnée mécaniquement lors d'une étape d'extrusion qui consiste à faire passer la solution lipidique à travers un filtre qui possède des pores de 100 nm de taille, pour cela nous utilisons un extruder (cette étape peut demander de rediluer (d'un facteur 2 à 4) la solution lipidique pour faciliter l'extrusion en diminuant ainsi la pression exercée sur le filtre). Nous obtenons alors une solution homogène de vésicules membranaires unilamellaires de 50 nm de diamètre (en moyenne), que nous avons observé par

microscopie électronique à transmission. Cette solution est alors mise en contact avec FhaC en détergent qui a été préalablement marqué au MTSL (16mg de lipides pour environ 1mg de FhaC). Le tonneau β de FhaC se réintègre alors dans la bicouche lipidique des SUVs lors de l'ajout de billes de polystyrènes non polaires (« Biobeads ») qui vont capter les molécules de détergent présentes autour de FhaC. Il s'agit d'une étape longue qui nécessite un ajout de billes par petites quantités (40 mg par ml de solution) pendant plus de 4 heures sous agitation rotative douce afin que la déplétion en détergent soit la plus douce possible et prévenir ainsi la précipitation de nos protéines. Une dernière étape d'ultracentrifugation nous permet de séparer les protéines intégrées dans les SUVs (protéoliposomes) des protéines encore solubles en micelle de détergent (Fig. 31B). Le culot est ensuite ressuspendu dans environ 500 μ l de tampon Tris-HCl (le volume est à ajuster selon la quantité de FhaC pour l'analyse RPE).

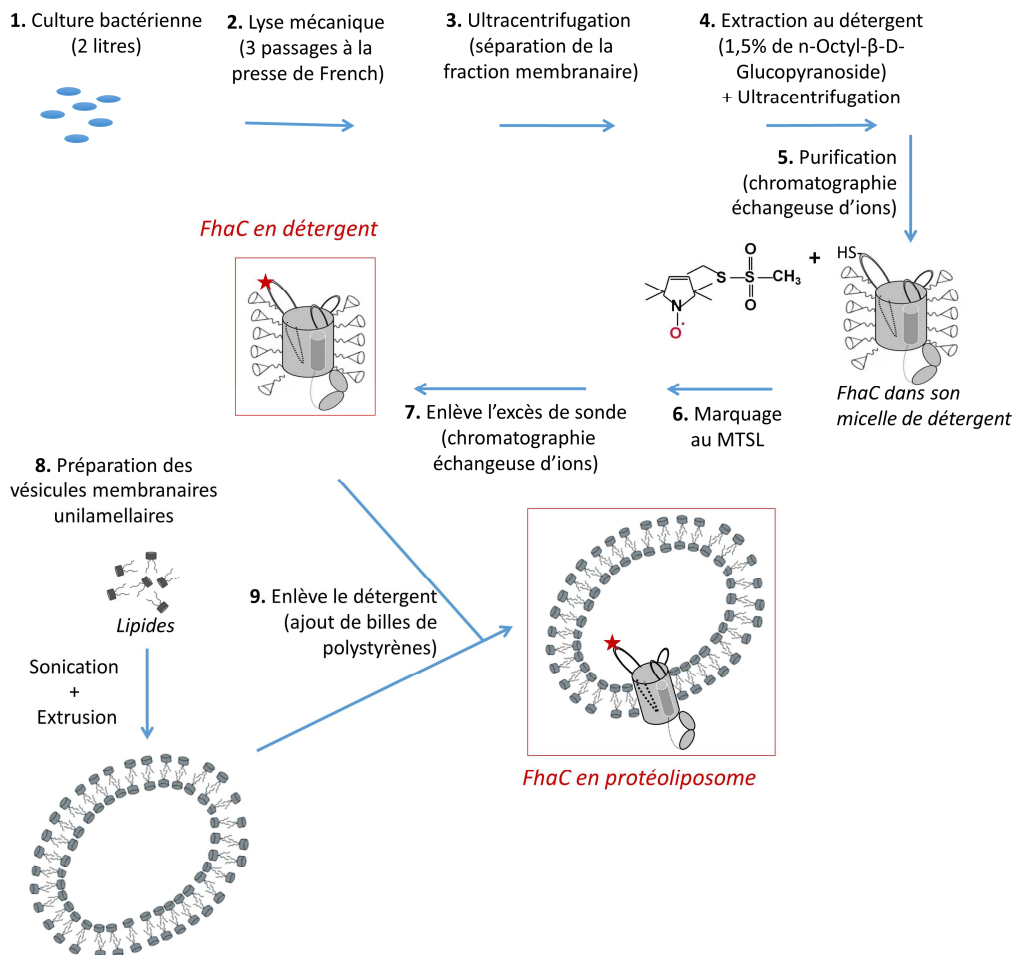


Figure 31B : Représentation des étapes nécessaires avant l'analyse de FhaC en RPE

FhaC ainsi reconstitué dans une membrane lipidique, nous avons pu détecter l'existence de conformations non prédites par la structure cristallographique. Une partie de ces travaux ont été valorisés par la publication d'un article dans le journal *Molecular Microbiology* traitant des changements conformationnels de FhaC sur la sortie de l'hélice α H1 (Guérin et al., 2014).

Dans notre publication, nous avons aussi caractérisé la topologie d'une chimère qui porte un domaine globulaire, BugE, fusionné au C terminus de Fha30. A l'instar des expériences réalisées sur l'autotransporteur EspP (voir plus haut, partie autotransporteurs), cette construction nous permet de travailler *in vivo* avec un intermédiaire bloqué en cours de translocation. Nous avons pu vérifier avec une chimère similaire, Fha30-Calmo, que cet état bloqué représente réellement un intermédiaire de translocation. En effet, la calmoduline est repliée en présence de Ca^{++} et peut être dépliée si cet ion est chélaté par de l'EGTA. Ainsi, on peut bloquer la chimère Fha30-Calmo à travers la membrane externe, puis déplier la calmoduline, ce qui permet à la chimère de poursuivre sa sécrétion et d'être retrouvée dans le milieu extérieur (voir les résultats supplémentaires de l'article ci-dessous). L'utilisation de telles chimères dans un complexe bloqué avec FhaC a servi d'une part à prouver que le pore formé par FhaC servait bien de passage à la FHA et d'autre part de caractériser le chemin emprunté par la FHA à l'intérieur du tonneau β lors de la translocation. Ces travaux seront prochainement publiés (en cours de révision). (**Annexe 2**)

**3. Publication : *Conformational dynamics of protein transporter FhaC:
large-scale motions of plug helix***

**Conformational dynamics of protein transporter FhaC:
large-scale motions of plug helix**

Jérémy Guérin^{1,2,3,4}, Catherine Baud^{1,2,3,4}, Nadia Touati⁵, Nathalie Saint⁶, Eve Willery^{1,2,3,4},
Camille Locht^{1,2,3,4}, Hervé Vezin^{5*}, Françoise Jacob-Dubuisson^{1,2,3,4*}

¹ Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity, Lille, France

² CNRS UMR8204, Lille, France

³ INSERM U1019, Lille, France

⁴ Univ Lille Nord de France, 59019 Lille, France

⁵ CNRS UMR8516, Villeneuve d'Ascq, France

⁶ INSERM U1046, CHU A. de Villeneuve, Montpellier cedex 05

* for correspondence : francoise.jacob@ibl.fr; herve.vezin@univ-lille1.fr

running title: conformational dynamics of FhaC

keywords: protein dynamics/ outer membrane/ two-partner secretion/ Omp85 superfamily/
electron paramagnetic resonance

Summary

FhaC is an integral outer membrane protein of the whooping cough agent *Bordetella pertussis* that mediates the transport to the cell surface of a major virulence factor, the filamentous haemagglutinin adhesin FHA. The FHA/FhaC pair is a prototypic TpsA/TpsB system of the widespread ‘Two-Partner Secretion’ pathway, dedicated to the transport of long extracellular proteins in various pathogenic and environmental Gram-negative bacteria. FhaC belongs to the ubiquitous Omp85 superfamily of protein transporters. The X-ray structure of FhaC shows that the transmembrane β -barrel channel hypothesized to serve as the FHA-conducting pore is obstructed by two structural elements conserved among TpsB transporters, an N-terminal α helix and an extracellular loop. Here, we provide evidence for conformational dynamics of FhaC related to the secretion mechanism. Using paramagnetic electron resonance, electrophysiology and *in vivo* approaches, we showed that FhaC exchanges between open and closed conformations. The interaction with its secretory partner FHA alters this distribution of conformations. The open conformation of FhaC implies a large displacement from the channel of the N-terminal ‘plug’ helix, which remains in the periplasm during FHA secretion. The membrane environment favours the dynamics of the TpsB transporter.

Introduction

The outer membrane of Gram-negative bacteria protects the cell against noxious compounds but represents a physical barrier for protein export. Thus, it contains specific transporters that export proteins mediating interactions with the environment. Among the protein secretion pathways, ‘Two-Partner Secretion’ (TPS) is dedicated to the secretion of extracellular proteins that fold into elongated β helices, both in pathogenic and non-pathogenic bacteria (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004, Jacob-Dubuisson *et al.*, 2013, van Ulsen *et al.*, 2013). TPS systems are essentially composed of two proteins, collectively called ‘TpsA partners’ for the secreted proteins and ‘TpsB partners’ for their cognate transporters (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001). TpsB transporters belong to the ubiquitous superfamily of Omp85 transporters, which mediate the insertion of their protein substrates into, or the translocation of their substrates across specific eukaryotic or prokaryotic membranes (Bos & Tommassen, 2004, Gentle *et al.*, 2005, Fairman *et al.*, 2011). Omp85 transporters share sequence motifs and have a largely conserved structure, indicating that they function along common principles (Gentle *et al.*, 2005, Jacob-Dubuisson *et al.*, 2009, Clantin *et al.*, 2007, Noinaj *et al.*, 2013, Gruss *et al.*, 2013).

The whooping cough agent *Bordetella pertussis* secretes its major adhesin, the \approx 220-kDa filamentous haemagglutinin FHA via a TpsB transporter, FhaC, and the FHA/FhaC pair represents a model TPS system. FhaC is an integral membrane protein composed of a 16-stranded, transmembrane β barrel preceded by a periplasmic moiety of two POTRA domains in tandem (Clantin *et al.*, 2007) (Fig. 1). The β barrel forms a pore hypothesized to serve as a translocation channel for FHA (Méli *et al.*, 2006). However, it is obstructed by both the N-terminal α helix H1 and the extracellular loop L6. The N terminus of H1 is close to the surface, and its C terminus at the periplasmic end of the barrel is joined to the first POTRA

domain by a 30-residue-long linker unresolved in the X-ray structure. L6 is a long extracellular loop joining β -barrel strands B11 and B12, folded back in the channel and that harbours sequence motifs conserved in the Omp85 superfamily (Clantin *et al.*, 2007, Jacob-Dubuisson *et al.*, 2009, Noinaj *et al.*, 2013, Gruss *et al.*, 2013). The mechanism of protein secretion in the TPS pathway is poorly understood. According to the current model, FHA is exported by the Sec machinery (Chevalier *et al.*, 2004). It remains in an extended conformation in the periplasm chaperoned by DegP, where its conserved, N-terminal ‘TPS’ domain is recognized by the POTRA domains of FhaC (Hodak *et al.*, 2006, Baud *et al.*, 2009, Delattre *et al.*, 2011). This interaction initiates the translocation of FHA across the outer membrane. FHA folds progressively into a long β helix at the cell surface, and the free energy released by tertiary structure acquisition is thought to power translocation of the following segments of the protein (Kajava *et al.*, 2001, Jacob-Dubuisson *et al.*, 2013). FhaC is the only protein required for the translocation of an FHA model protein *in vitro* (Fan *et al.*, 2012). Whether FHA passes through the FhaC pore itself or at the protein-lipid interface has however not been determined. If FhaC forms the pore for FHA transport, large-scale motions are expected to open a translocation path. A highly dynamic pore has been suggested by the fast oscillations of the FhaC channels in electrophysiology experiments (Méli *et al.*, 2006).

In this work, we sought to characterize the conformational dynamics of FhaC by using *in vivo* techniques, as well as electrophysiology and electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy on the purified protein reconstituted in a lipid bilayer. We uncovered a dynamic equilibrium between distinct conformations of the N-terminal helix and the following linker region, which is modified by interactions with the FHA partner. The conformational dynamics of these regions of FhaC, with H1 moving to the periplasm, is linked to the secretion of its partner. This study emphasizes the importance of the membrane environment

to study TPS mechanisms, and likely also those of other Omp85 transporters (Noinaj *et al.*, 2013).

Results

H1 and linker mobility by continuous-wave electron paramagnetic resonance (CW EPR) spectroscopy

Site-directed spin labelling and CW EPR spectroscopy were used to assess the mobility of various regions of FhaC in detergent or lipid media. Single Cys residues were introduced at solvent-accessible positions of the protein, preferentially in loops to minimize structural constraints (Fig. 1). The substitutions did not affect FhaC function, except for FhaC Δ H1_{Cys33} and FhaC_{Cys452}, which nevertheless retained 20% of secretion activity. The paramagnetic molecule MTSL (*S*-(2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)methyl methanesulfonothioate) was used to covalently label each FhaC_{Cys} variant, and the resulting side chain was called R1. The global shape of room-temperature CW EPR spectra reflects the degree of R1 motion. Narrow peaks are typical of positions with a high mobility and large amplitude motions, while broad spectra with large peaks reflect motions restricted by a rigid backbone or tertiary interactions (McHaourab *et al.*, 1996, Rice *et al.*, 2013).

To investigate channel opening, we focused on H1, the linker, the POTRAs and L6 and used extracellular and periplasmic loop positions as controls. MTSL did not label wild-type (wt), cysteine-less FhaC (Fig. S1). EPR spectra of FhaC_{187-R1} harbouring R1 in POTRA2 reflected an intermediate mobility, both in detergent solution and in small unilamellar lipid vesicles (SUVs) (Figs. 2, S1 and S2). We then added an FHA fragment, Fha30_{N66I} (hereafter called FHA or the substrate) to determine how interaction with its partner would affect the

110 EPR spectra of FhaC. Fha30, which is the smallest secretion-competent portion of FHA,
111 comprises the TPS domain followed by 3 additional β -helical coils (Clantin *et al.*, 2004).
112 Here we produced a secretion-incompetent version of Fha30, Fha30_{N66L}, in an insoluble form
113 and purified it in urea. The N₆₆I substitution affects the folding of Fha30, thus favouring an
114 extended conformation of the substrate after urea dilution and enhancing its interaction with
115 FhaC. Thus, addition of Fha30_{N66I} caused the appearance of a more rigid component that
116 might reflect tertiary interactions of R1 with FHA (Delattre *et al.*, 2011) (Figs. 2, S1 and S2).
117 In contrast, substrate addition to FhaC_{86-R1}, FhaC_{503-R1} or FhaC_{483-R1}, harbouring R1 in
118 POTRA1, the extracellular loop L7 or a periplasmic loop, respectively, did not cause spectral
119 changes (Figs. 2 and S1).

120 The EPR spectra of FhaC_{4-R1} harbouring R1 close to the N terminus indicated essentially a
121 fast-motion regime in detergent solution (Fig. 2). In marked contrast, the FhaC_{4-R1} spectra in
122 SUVs showed a large dispersion, with two components corresponding to distinct R1 mobility
123 regimes (Figs. 2 and S2). The low-mobility-regime component, unexpected from the crystal
124 structure, reflects conformations in which R1 motions are restricted by tertiary interactions,
125 probably with neighbouring side-chains of the barrel or the extracellular loops. Substrate
126 addition increased the proportion of the fast-motion regime component and decreased that of
127 the slow one, indicating a less constrained conformation of H1.

128 The spectra of FhaC_{33-R1} showed that R1 at the N terminus of the linker that connects H1 to
129 POTRA1 is mostly immobilized in SUVs and in detergent (Figs. 2, S1 and S2). Substrate
130 addition increased the fast-motion component and decreased the rigid one, suggesting a shift
131 towards more mobile linker conformations. To further investigate this dynamics, we also
132 analyzed linker motions in a variant lacking H1, FhaC Δ H1_{33-R1} (Méli *et al.*, 2006). The
133 proportions of the fast and rigid components were similar, indicating that the linker is much
134 more mobile when H1 was genetically removed than in wt FhaC, and FHA addition yet

enhanced the fast spectral component (Figs. 2 and S2). Thus, in the wt situation where H1 is present, the N-terminal part of the linker is constrained and forms tertiary contacts, presumably with the POTRAs, which are released upon FHA-FhaC recognition. We checked that the addition of a non-relevant protein did not affect the spectra (Fig. S1). In the absence of H1, the linker is considerably less constrained. At the linker C terminus, in contrast, the intermediate mobility regime of R1 remained unchanged by substrate addition (FhaC_{58-R1}, Fig. S1).

Analyses of L6 mobility were performed using FhaC_{434-R1} and FhaC_{452-R1}, with spin labels in the beginning and the middle of L6, respectively. Large distributions of rigid-motion regimes were observed for the two variants (Figs. 2 and S1). This indicated that L6 is considerably constrained in the barrel pore, although possibly not in a single conformation. For FhaC_{452-R1}, the addition of FHA somewhat narrowed the distribution of the rigid conformations. The spectral component corresponding to an immobilized conformation was yet more prominent for FhaCΔH1_{452-R1}, with or without substrate, which indicates that L6 mostly adopts a rigid conformation in the absence of H1. Thus, the tip of L6 is largely immobilized irrespective of FHA, most likely because it is involved in tertiary interactions.

Evidence for periplasmic location of H1 by pulsed-electron double-resonance (PELDOR) spectroscopy

To determine the locations of H1 with or without FHA, we performed inter-spin distance measurements on FhaC variants with two spin labels using PELDOR spectroscopy at 50 K, which freezes the protein conformations. For FhaC_{4-R1+503-R1} harbouring R1s both at the N-terminus and in the extracellular loop L7, measurement of the T2 transverse relaxation time

revealed a value of 600 ns. Such small T2 values occur for membrane proteins (Bordignon, 2012) but limit the distances measurable in those systems. The T2 value was not increased by deuterium exchange. We also checked the absence of intermolecular spin interactions using single-label FhaC_{503-R1}, which showed homogeneous echo decay (Fig. S3). The proportion of double-labelled FhaC_{4-R1+503-R1} was estimated to be 60% and could not be improved by longer labelling times or higher MTSL concentrations. Therefore, the modest T2 value and signal-to-noise ratio reflect limitations inherent to our experimental system.

Short distance distributions centred at 2.3 and 2.7 nm were extracted from the FhaC_{4-R1+503-R1} PELDOR signals, in reasonable agreement with distances of 2.4, 3 and 3.3 nm predicted by simulations of the MTSL rotamers based on the X-ray structure (Figs. 3A and 4A). In the presence of the substrate T2 increased to 1.1 μ s, enabling us to measure a majority 4.3-nm distance distribution between R1s, in addition to those around 2.3 and 2.7 nm whose contributions were significantly reduced. The 4.3-nm distance implies that the N terminus of FhaC is further away from L7 than expected from the X-ray structure and thus most likely located close to the periplasmic entrance of the barrel (Fig. 3A). The persistence of the minority 2.3 and 2.7 nm distances indicates that some FhaC molecules were not affected by substrate addition, possibly because they did not have the proper orientation in the SUVs or because association and dissociation between FHA and FhaC is very dynamic (Delattre *et al.*, 2011).

We performed a triangulation by measuring inter-spin distances between the N terminus of FhaC and POTRA2 in FhaC_{4-R1+187-R1}. The simulation of the MTSL rotamers based on the crystal structure yielded expected distances of 4.9 and 5.7 nm, which could not be measured because of a T2 value of 680 ns (Figs. 3B and 4B). Yet, unexpected distance distributions centred at 2.8 and 3.5 nm were extracted from the signals, implying alternative FhaC conformations with the N terminus close to POTRA2, possibly midway down the β -barrel or

at the periplasmic side of FhaC (Fig. 3B). In the presence of the substrate, distances centred at 2, 2.7 and 3.2 nm were obtained. The new, majority 2-nm distance strongly supports a periplasmic location of the N terminus yet closer to POTRA2. The occurrence of three distances indicates that H1 does not assume a single position, consistent with the increased mobility of R1 for FhaC_{4-R1} in the presence of the substrate (Fig. 2). The imperfect match of the distances with and without substrate might also suggest some displacement of the POTRA domains in addition to H1 motions, as has been observed in crystal forms of BamA, another member of the Omp85 superfamily (Noinaj *et al.*, 2013).

Channel activity of FhaC with H1 plug

FhaC forms ion-permeable channels that have been hypothesized to reflect the protein-conducting pore (Méli *et al.*, 2006). We serendipitously found out that a proportion of purified FhaC_{4-Cys+503-Cys} harboured a spontaneously formed intra-molecular disulfide (S-S) bond between the N terminus and L7. Using this variant we thus investigated the functional consequences of blocking H1 in the barrel by performing single-channel electrophysiology experiments. Two types of traces were observed, consistent with two FhaC species (Fig. 5). The species-I traces with fast opening/closing kinetics were reasonably similar to those of wt FhaC (Méli *et al.*, 2006) or FhaC_{4-Cys}. The species-II traces showed very little conductance, but addition of a reducing agent, TCEP, restored a channel I-like profile. TCEP did not affect FhaC_{4-Cys} or type-I FhaC_{4-Cys+503-Cys} channels. Thus, species II corresponds to a constricted form of FhaC, with H1 blocked in the pore, and S-S bond reduction increased channel activity most likely by enabling H1 to leave the pore.

Periplasmic location of H1 in vivo

FhaC thus appears to adopt different conformations *in vitro*, even in the absence of its substrate. To probe the existence of alternative conformations *in vivo* as well, we looked for spontaneous intra-molecular S-S bond formation using various combinations of Cys substitutions in order to reveal specific locations of H1. To avoid S-S bond formation during sample preparation, the cells were treated with N-ethylmaleimide prior to lysis and immunoblotting. Two FhaC bands, one corresponding to the expected mass and the other to an S-S-bond-containing species that disappeared in the presence of a reducing agent, were detected in several cases (Figs. 6 and S4). Thus, with one Cys residue at position 4 (Cys₄) and another in each of the extracellular loops L3 (Cys₃₀₃), L5 (Cys₃₉₁), L7 (Cys₅₀₃) or at the extracellular end of B5 (Cys₂₉₀) or B7 (Cys₃₃₇), two distinct FhaC bands were present. Cys₈ at the H1 N terminus also formed an intra-molecular S-S bond with Cys₃₉₁. Altogether, thus, the results indicated both lateral and vertical motions of H1 within the barrel, in agreement with PELDOR and electrophysiology results. In contrast, no S-S bond was formed between Cys₂₆ at the C terminus of H1 or Cys₃₂ in the linker and Cys₃₉₁ in L5 or Cys₅₀₃ in L7, arguing that these regions are not found at the extracellular side of FhaC (Fig. 6). This result and the absence of detectable aggregates in our samples show that S-S formation was specific to certain combinations of Cys residues. The S-S bonds were also present in a *dsbA*⁻ background, which showed that their formation occurred after FhaC biogenesis in aerated culture conditions (Fig. 6B).

Spontaneous S-S bonds also formed between Cys₄ and each of Cys₁₀₇, Cys₁₄₂, Cys₁₈₇, Cys₁₉₅ and Cys₂₀₄ in POTRA1 or POTRA2, supporting a range of periplasmic locations of the N terminus (Figs. 6 and S4). Cys₂₀₄ in POTRA2 also formed S-S bonds with Cys₈, Cys₂₆ and Cys₃₂ at the N and C termini of H1 and at the N terminus of the linker, respectively, which indicates that H1 can occupy various positions relative to POTRA2. Notably, H1-POTRA cross-linked products were observed in the absence of the substrate, indicating that “resting”

233 FhaC can actually exist in an open form. S-S bond formation likely displaced the equilibrium
234 between the distinct conformations *in vivo*, as did the addition of FHA to FhaC *in vitro* (Figs.
235 2 and 3).

236 To confirm these *in vivo* conformational changes, we used the FhaC_{3-myc} variant that
237 harbours an N-terminal Myc epitope . Surface accessibility of this epitope in bacteria
238 producing FhaC_{3-myc} was shown by flow cytometry analyses, corroborating the model of a
239 barrel essentially obstructed by H1 in resting FhaC (Figs. 7 and S5). Next, to block FhaC in
240 an active conformation, we co-expressed it with a chimera between a 30-kDa FHA truncate
241 called Fha30 and the globular periplasmic protein BugE (Huvent *et al.*, 2006) (Fig. 8A).
242 Unlike Fha30 alone, which was mostly released into the milieu, the Fha30-BugE chimera
243 remained cell-associated (Fig. 8B). Flow cytometry analyses of bacteria that produce Fha30-
244 BugE variants with an N-terminal or a C-terminal myc tag established the topology of the
245 chimera (Fig. 8D,E). Fha30-BugE stalls across the outer membrane, with its Fha30 moiety
246 exposed to the cell surface and BugE in the periplasm (Figs. 8B-E and S6). Analyses of a
247 similar Fha30-calmodulin chimera showed that the stalled protein could resume translocation
248 after unfolding of calmodulin by EGTA (Fig. S7). Thus, such chimeras mimic secretion
249 intermediates and can be used to gain access to FhaC in action.

250 Flow cytometry analyses of bacteria co-producing Fha30-BugE with FhaC_{3-myc} showed a
251 dramatic reduction of fluorescence labelling compared with FhaC_{3-myc} alone, supporting an
252 open conformation of FhaC with H1 in the periplasm when the transporter secretes its
253 substrate (Fig. 7A). This was not observed when the short, secretion-competent Fha30
254 substrate was co-expressed with FhaC_{3-myc}, indicating that after secretion the channel mostly
255 resumes a closed conformation (Fig. 7A).

Confirmation of H1 movements between the pore and the periplasm was obtained by another approach. We used a smaller reagent, a 5-kDa, sulfhydryl-specific PEG-maleimide (PEG-Mal), to label the FhaC_{8-cys} variant harbouring a Cys residue at the N terminus of H1. FhaC_{8-cys} was covalently labelled with PEG-maleimide when produced alone but very little when co-produced with the chimera. Conversely, it spontaneously formed a DTT-sensitive species migrating at the size expected for an FhaC dimer when it was produced with the chimera but not alone (Fig. 7B). Altogether, our *in vivo* analyses strongly support conformational exchanges between open and closed states of the FhaC channel in the secretion cycle. H1 is in the periplasm during FHA translocation, and mostly, but not exclusively in the pore in the resting state and after completion of secretion.

Discussion

EPR spectroscopy is a technique of choice to investigate conformational changes of membrane proteins expected to be highly dynamic like TpsB transporters. In this work, we uncovered remarkably large conformational changes that take place in the early steps of the two-partner secretion cycle. EPR, electrophysiology and *in vivo* analyses concurred to show that H1 and the linker sample various conformations even in the ‘resting’ state. The open conformation exists in the resting state but it is sparsely populated, while it is favoured by the presence of FHA.

The two spectral components found for FhaC_{4-R1} correspond to markedly different mobility regimes of the FhaC N-terminus. In addition to reflecting the resting state of FhaC, the high-mobility component might also encompass a minority conformation of FhaC with its N terminus in the periplasm in the absence of the substrate. This conformation is supported by the *in vivo* formation of S-S bonds between Cys₄ and POTRA residues. The rigid component

of the FhaC_{4-R1} spectra reflects a conformation in which the N-terminal segment is constrained by tertiary interactions, presumably within the barrel. PELDOR measurements also supported the occurrence of vertical motions of H1 down the channel. Similarly, the majority, low-mobility regime component of the FhaC_{33-R1} spectra indicated tertiary interactions between the N-terminal part of the linker and presumably POTRA2. The presence of FHA increased the mobility of both H1 and the linker, indicating that it releases them from interactions within FhaC.

The conformational distributions of H1 and the linker might represent distinct, non-exchanging conformations of FhaC. However, the addition of FHA markedly affected these distributions. Flow cytometry analyses also strongly supported the occurrence of conformational exchanges between open and closed states *in vivo* in the course of translocation, as did the spontaneous formation of intra-molecular S-S bonds for specific Cys combinations. Because of the covalent nature of the S-S bond, the internally cross-linked species accumulated over the time of cultures, thus facilitating the detection of minor forms, such as the open conformation of FhaC in the absence of FHA. Altogether thus, our data strongly support a conformational equilibrium of FhaC irrespective of its substrate.

Conformational exchange between the open and closed states of FhaC most likely facilitates substrate binding to the POTRAs at the initiation of secretion. In the absence of FHA, FhaC is mostly in a closed form, and the extended linker occupies part of the substrate-interaction site along POTRA2 (Delattre *et al.*, 2011). In the open conformation, the substrate-recognition sites are more accessible. FHA selects the conformational states of FhaC with which it can interact and displaces the conformational equilibrium in that direction by out-competing linker-POTRA interactions. This ensures productive interactions of FHA with an open, secretion-competent transporter. The open conformation persists throughout secretion, as shown by the conformation of FhaC trapped in action. At that stage, however,

outer membrane permeability is limited, because the pore is most likely occupied by the substrate. The FhaC channel closes back after FHA secretion, as indicated by the conformation of FhaC in the presence of a short, secretion-competent model substrate. The different conformational states of FhaC must have similar free energy levels, because no energy source is available in the periplasm or at the outer membrane. Whether dynamics of the FhaC barrel itself facilitates the conformational exchanges remains to be investigated. β -barrel dynamics has been proposed for other members of the Omp85 family (Stegmeier & Andersen, 2006, Bos & Tommassen, 2004, Gruss *et al.*, 2013, Noinaj *et al.*, 2013).

As in FhaC, an N-terminal α helix and a non-structured region are predicted to precede POTRA1 in many TpsB proteins (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2009) (Fig. 9). Thus, it is likely that the dynamics uncovered here for FhaC will apply to other TpsB transporters. An N-terminal helix probably ensures that in the absence of their specific substrates TpsB transporters are essentially in a low-permeability conformation, limiting the penetration of noxious compounds through the outer membrane. This is supported by the increased sensitivity to antibiotics of bacteria harbouring FhaC- Δ H1 (Clantin *et al.*, 2007). In addition, by interacting with the POTRA domains the linker could limit non-productive periplasmic interactions of FhaC with irrelevant proteins that share structural similarity, i.e. extended, amphipathic stretches, with its TpsA substrate FHA.

The conserved L6 loop is essential for secretion (Clantin *et al.*, 2007, Delattre *et al.*, 2010), and our previous work has indicated that it changes conformation upon FHA translocation (Guédin *et al.*, 2000). Similar observations were made for another Omp85 protein, BamaA (Rigel *et al.*, 2012). Here, we showed that the position and conformation of L6 were little affected by substrate binding to FhaC. However, our *in vitro* system did not enable us to probe later steps of the translocation process by EPR. Thus, it is quite possible that L6

undergoes larger conformational changes after the substrate is committed to translocation. We are beginning to track successive modifications of FhaC in the course of the secretion cycle, but thus far the role of L6 in FhaC and more largely, in Omp85 transporters, remains an unanswered question.

We have uncovered different dynamics for FhaC in detergent and micelles, although this effect is strongly position-dependent. The lipid environment appears to favour conformations inaccessible or poorly accessible in micelles. Spectral differences between the two milieus were also reported in an EPR study of another family of OM β barrel proteins (Fanucci *et al.*, 2002, Fanucci *et al.*, 2003). This work thus emphasizes the importance of studying the TPS mechanism in a membrane environment as already suggested by earlier work (Fan *et al.*, 2012). It is likely that similar findings will apply to the Omp85 superfamily as a whole.

Experimental procedures

Plasmids

Mutations in *fhaC* were generated using the QuikChange II XL Kit (Agilent Technologies) on pFcc3 or pFcc3 Δ 3-26 (Guédin *et al.*, 2000). Derivatives of pT7FcW (Clantin *et al.*, 2007) were constructed for production and purification of the FhaC variants. pHod6N₆₆I (Hodak *et al.*, 2006), pGB-BctE (Antoine *et al.*, 2005), pBBItac138b (Alsteens *et al.*, 2013) and pBBItac141b (this work) code for Fha30_{N66I}, the GB1-BctE control protein, secreted Fha30 and Fha30-BugE, respectively. For the Fha30-BugE chimera, the *bugE* mature sequence was amplified by PCR from *B. pertussis*, the amplicon was restricted by BamHI and introduced at the 3' end of *fha30* into the same site of pEC138b (Alsteens *et al.*, 2013), and the orientation and sequence of *bugE* were verified, yielding pEC141b. To introduce a myc epitope at the N terminus or at the C terminus of Fha30-BugE, 627-bp EcoRI-NotI and 951-bp BamHI-HindIII

synthetic gene fragments were purchased from GeneArt and exchanged for their wt counterparts in pEC141b, yielding pEC141-Nmyc and pEC141-Cmyc. The calmodulin gene was amplified from pEH3-Hpb-calmo (Jong *et al.*, 2007) and cloned as a BamHI-HindIII fragment at the 3' end of *fha30*, yielding pEC140-calm. The EcoRI-HindIII fragments from the pEC plasmids were introduced into pBBItac (Alsteens *et al.*, 2013) for IPTG-regulated expression, yielding pBBItac138b (Fha30), pBBItac141b (Fha30-BugE), pBBItac141-Nmyc (Fha30-BugE with N-terminal myc), pBBItac141-Cmyc (Fha30-BugE with C-terminal myc) and pBBItac140-calm (Fha30-calmodulin).

Protein purification and spin labelling

Fha30_{N66I} (Hodak *et al.*, 2006) and GB1-BctE (Antoine *et al.*, 2005) were purified in 6 M urea on Ni²⁺ columns and concentrated to 10 mg mL⁻¹. The N₆₆I substitution retards TPS domain folding for interaction with FhaC. For FhaC purification, 3 mM tris(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP, Sigma) was added before chromatography, which was performed as described in (Clantin *et al.*, 2007). FhaC-containing fractions were mixed with a 10-fold molar excess of MTSL (Toronto Research Chemicals), incubated at 20°C under gentle agitation for 4-8 hours, diluted 10 folds, subjected to ion-exchange chromatography in 0.8% Elugent and eluted in 4 mL with 600 mM NaCl.

Protein reconstitution in liposomes

E. coli Polar lipids (Avanti) solubilised in chloroform (50 mg in 6 ml) were evaporated under argon. The pellet was suspended in 3 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) (T₅₀) and sonicated. Liposomes were extruded through a 100-nm-pore polycarbonate membrane (Sigma), and the resulting SUVs were mixed with FhaC (16/1; w/w) at 20°C, under gentle agitation for 1 h.

Proteoliposomes were formed by detergent removal with progressive addition of wet Biobeads SM2 (Bio-Rad) to 40 mg mL⁻¹ for 4 h, under gentle agitation. After bead removal, proteoliposomes were collected by ultracentrifugation (150,000 x g, 1 h, 12°C) and resuspended in 450 µL of 50 mM T₅₀. All steps were performed under argon.

EPR experiments

Spin-labelled FhaC (60 µM; 200 µL) was injected into a quartz capillary tube with a useful volume of 50 µL. CW-EPR spectra were recorded at 296 K, and the PELDOR experiments were performed at 50 K. CW spectra were recorded on an ESP 300E Bruker spectrometer equipped with an ELEXSYS Super High Sensitivity resonator operating at 9.8 GHz, and the microwave power was set to 10 mW, with a magnetic field modulation frequency of 100 kHz and the amplitude of 0.1 mT. The samples were recorded with accumulation of 5 to 15 spectra depending on labelling efficiency. The signal quickly decreased over time for FhaC in SUVs, preventing long accumulation to improve the signal/noise ratio. Different preparations of the same FhaC variant yielded highly reproducible spectra. Fha30_{N66I} or the irrelevant GB1-BctE substrate (30 µL of a 330 µM solution in 6 M urea) was added where indicated. The same amount of urea alone did not affect the spectra. In some cases substrate addition decreased the EPR signal, probably because of residual Ni⁺⁺ ions in the preparations. Selected CW-EPR spectra were simulated using the Easyspin software package (Chili) under Matlab to extract the proportions of the fast and slow populations (Stoll & Schweiger, 2006). The order parameter was calculated as in (Seelig, 1970).

The PELDOR experiments were performed at 50 K with a Bruker ELEXSYS E580 X band spectrometer using the standard MD5 dielectric resonator and equipped with an Oxford helium temperature regulation unit. The T₂ transverse relaxation time was measured using 2-pulse-echo Hahn decay for each sample. The T₂ value was used to evaluate the dipolar time

domain extent allowed for distance measurements. The experiments were performed using the four-pulse DEER sequence $(\pi/2)v_1-\tau_1-(\pi)v_1-\tau-(\pi)v_2-(\tau_1 + \tau_2)-\tau-(\pi)v_1-\tau_2$ -echo (Jeschke *et al.*, 2002). The pump pulse (v_2) length was set to 20 ns and applied at the maximum of the left part of the spectrum with the optimization of the amplitude set to the maximum of echo inversion. The observer pulses (v_1) $\pi/2$ and π lengths were set to 16 and 32 ns, respectively, and positioned at a 70 MHz higher frequency. As T_2 is very short (0.6-1.2 μ s), the τ_1 value was set to 136 ns for short T_2 and to 200 ns for higher ones in order to maximize the signal-to-noise ratio. τ_2 was set to 1.2 μ s due to these short T_2 values. Calculations of the expected distances based on the X-ray structure of FhaC (pdb: 2qdz) were performed using the molecular mechanics software MMM (Polyhach *et al.*, 2011). Estimation of double labelling was performed using FhaC_{-503-R1} as a reference for integral spectrum calculation. Signal processing was achieved using the DeerAnalysis2011 software package under Matlab (Jeschke *et al.*, 2006). The signal was corrected by subtracting the un-modulated background echo decay using a homogeneous three-dimensional spin distribution. The Tikhonov regularization was applied to the corrected dipolar evolution dataset to obtain the distance distributions (Tikhonov & Arsenin, 1977). DE Fit (Sen *et al.*, 2007) was used in addition to DeerAnalysis2011 to strengthen the analysis. Both provided the same distances with slightly different proportions of the populations.

Electrophysiology experiments

Planar lipid bilayers were formed by painting a lipid solution of azolectin (type IV S, Sigma) across a 200- μ m aperture in a polysulfonate cup (Warner Instruments) separating two chambers of 1 mL each. The final concentration of lipids was 45 mg mL⁻¹ dissolved in decane. The *trans* chamber compartment was connected to the headstage input of a bilayer clamp amplifier (BC-535, Warner Instruments). The *cis* chamber was held at virtual ground.

Voltages were applied to the planar lipid bilayers through Ag-AgCl electrodes connected to the chambers via agar/KCl bridges. Both *cis* and *trans* chamber solutions were composed of 1 M KCl, 10 mM HEPES, pH 7.4. Several microlitres of purified proteins diluted 1000-fold in 1% octyl-polyoxyethylene solution were added to the *cis*-compartment. Recorded single-channel currents were filtered at 1 kHz and digitized at 4 kHz. Data acquisition was performed by using Digidata 1440A and Axoscope 10.2 software, and the recordings were analyzed by using Clampfit 10.2 (Molecular Devices).

Other techniques

The secretion assays were performed as described (Delattre *et al.*, 2011). For S-S bond detection, cell pellets were treated with 5 mM N-Ethylmaleimide (Sigma) to prevent S-S bond formation during sample preparation and heated at 70°C for 15 minutes in Laemmli buffer without reducing agent. For PEG-ylation reactions, cells were washed, resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) containing 30 µM Mal-PEG-5K (Creative PEGwork) and incubated at 20°C for 1 hour without stirring. They were washed twice in PBS and resuspended in Laemmli buffer without reducing agent. Immunoblotting was performed with an anti-FhaC antibody (Delattre *et al.*, 2011). *E. coli* JCB571 (*dsbA::kan*) and its parent JCB570 were described in (Bardwell *et al.*, 1991).

For flow cytometry analyses, *E. coli* UT5600 carrying the respective expression plasmid(s) was grown in LB to $A_{600} = 0.8$ and treated with 1 mM IPTG to induce Fha30 or the Fha30-BugE chimera for 2.5 h before harvesting. Cell pellets from 1-ml cultures were washed with ice-cold PBS, 3% BSA, 1% NaN₃, incubated with FITC-conjugated anti-myc antibody (Abcam) for 1 h in the dark, washed twice and resuspended in 500 µl PBS. Data were acquired on a LSR Fortessa using a photomultiplier to increase the FSC signal and analyzed with the FACS Diva Software (Becton-Dickinson).

The *in vivo* topology of Fha30-BugE across the outer membrane was investigated by flow cytometry analyses using UT5600 expressing pBBI_{lac}141-Nmyc (coding for Fha30-BugE-myc_{N-term}) or pBBI_{lac}141-Cmyc (coding for Fha30-BugE-myc_{C-term}), alone or with pFc3 (coding for untagged FhaC). Labelling with the FITC anti-myc antibody was performed at 4°C for 3 h in the dark, and the centrifugations were performed at low speed (1000 g) to avoid membrane damage.

Analysis of the Fha30-calmodulin chimera was performed as follows. UT5600(pFc3, pBBI_{lac}140-calm) co-expressing the chimera and FhaC was grown in five 20-mL cultures in minimal M9 medium with 20 mM glucose and 1 mM MgSO₄ supplemented with 100 µM CaCl₂ (flasks #1, 4 and 5), 200 µM EGTA (flask #2) or 200 µM EGTA + 200 µg/mL chloramphenicol to prevent protein synthesis (flask #3). After reaching A₆₀₀ = 0.7, the cultures were treated with 1 mM IPTG to induce expression of the chimera. Ca⁺⁺ ions stabilize the folded state of calmodulin, while EGTA has the opposite effect. Cultures #1, 2 and 3 were stopped after 1h30. Cultures #4 and #5 were washed and resuspended in the same medium supplemented with 100 µM CaCl₂ + 200 µg/mL chloramphenicol (#4) or 200 µM EGTA + 200 µg/mL chloramphenicol (#5) and grown for 1h20. Culture supernatants and cell lysates were analysed by immunoblotting with an anti Fha30 antiserum raised in a guinea pig (Eurogentec).

Acknowledgements

We thank Emmanuelle Petit and Nicolas Barois for technical help, Drs. Matthias Müller and Enguo Fan for fruitful discussions, Drs. Valérie Belle and Isabelle Landrieu for comments on the manuscript, and the TGE FR3443 CNRS for the spectrometers. J. G. received a predoctoral scholarship from the Institute Pasteur de Lille and the Region Nord Pas de Calais. This work was supported by the grant ANR Blanc DYN-FHAC 2010-2014 to F. J-D.

References

- Alsteens, D., N. Martinez, M. Jamin & F. Jacob-Dubuisson, (2013) Sequential unfolding of beta helical protein by single-molecule atomic force microscopy. *PLoS ONE* **8**: e73572.
- Antoine, R., I. Huvent, K. Chemlal, I. Deray, D. Raze, C. Locht & F. Jacob-Dubuisson, (2005) The periplasmic binding protein of a tripartite tricarboxylate transporter is involved in signal transduction. *J Mol Biol* **351**: 799-809.
- Baud, C., H. Hodak, E. Willery, H. Drobecq, C. Locht, M. Jamin & F. Jacob-Dubuisson, (2009) Role of DegP for two-partner secretion in *Bordetella*. *Mol Microbiol* **74**: 315-329.
- Bordignon, E., (2012) Site-directed spin labeling of membrane proteins. *Top Curr Chem* **321**: 121-157.
- Bos, M. P. & J. Tommassen, (2004) Biogenesis of the Gram-negative bacterial outer membrane. *Curr Opin Microbiol* **7**: 610-616.
- Chevalier, N., M. Moser, H. G. Koch, K. L. Schimz, E. Willery, C. Locht, F. Jacob-Dubuisson & M. Muller, (2004) Membrane targeting of a bacterial virulence factor harbouring an extended signal peptide. *J Mol Microbiol Biotechnol* **8**: 7-18.
- Clantin, B., H. Hodak, E. Willery, C. Locht, F. Jacob-Dubuisson & V. Villeret, (2004) The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 6194-6199.
- Clantin, B., A. S. Delattre, P. Rucktooa, N. Saint, A. C. Meli, C. Locht, F. Jacob-Dubuisson & V. Villeret, (2007) Structure of the membrane protein FhaC: a member of the Omp85-TpsB transporter superfamily. *Science* **317**: 957-961.
- Delattre, A. S., B. Clantin, N. Saint, C. Locht, V. Villeret & F. Jacob-Dubuisson, (2010) Functional importance of a conserved sequence motif in FhaC, a prototypic member of the TpsB/Omp85 superfamily. *FEBS J* **277**: 4755-4765.
- Delattre, A. S., N. Saint, B. Clantin, E. Willery, G. Lippens, C. Locht, V. Villeret & F. Jacob-Dubuisson, (2011) Substrate recognition by the POTRA domains of TpsB transporter FhaC. *Mol Microbiol* **81**: 99-112.

- Dwyer, R. S., Ricci, D. P., Colwell, L. J., Silhavy, T. J., & Wingreen, N. S., (2013) Predicting functionally informative mutations in *Escherichia coli* BamA using evolutionary covariance analysis. *Genetics* **195**: 443-455.
- Fairman, J. W., N. Noinaj & S. K. Buchanan, (2011) The structural biology of beta-barrel membrane proteins: a summary of recent reports. *Curr Opin Struct Biol* **21**: 523-531.
- Fan, E., S. Fiedler, F. Jacob-Dubuisson & M. Muller, (2012) Two-partner secretion of gram-negative bacteria: a single beta-barrel protein enables transport across the outer membrane. *J Biol Chem* **287**: 2591-2599.
- Fanucci, G. E., N. Cadieux, C. A. Piedmont, R. J. Kadner & D. S. Cafiso, (2002) Structure and dynamics of the beta-barrel of the membrane transporter BtuB by site-directed spin labeling. *Biochemistry* **41**: 11543-11551.
- Fanucci, G. E., K. A. Coggeshall, N. Cadieux, M. Kim, R. J. Kadner & D. S. Cafiso, (2003) Substrate-induced conformational changes of the periplasmic N-terminus of an outer-membrane transporter by site-directed spin labeling. *Biochemistry* **42**: 1391-1400.
- Gentle, I. E., L. Burri & T. Lithgow, (2005) Molecular architecture and function of the Omp85 family of proteins. *Mol Microbiol* **58**: 1216-1225.
- Gruss, F., F. Zahringer, R. P. Jakob, B. M. Burmann, S. Hiller & T. Maier, (2013) The structural basis of autotransporter translocation by TamA. *Nat Struct Mol Biol* **20**: 1318-1320.
- Guédin, S., E. Willery, J. Tommassen, E. Fort, H. Drobecq, C. Locht & F. Jacob-Dubuisson, (2000) Novel topological features of FhaC, the outer membrane transporter involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Biol Chem* **275**: 30202-30210.
- Hodak, H., B. Clantin, E. Willery, V. Villeret, C. Locht & F. Jacob-Dubuisson, (2006) Secretion signal of the filamentous haemagglutinin, a model two-partner secretion substrate. *Mol Microbiol* **61**: 368-382.
- Huvent, I., H. Berhali, R. Antoine, C. Bompard, C. Locht, F. Jacob-Dubuisson & V. Villeret, (2006) Structural analysis of the glutamate receptor BugE of *Bordetella pertussis* in a bound conformation. *Acta Cryst. D* **62**: 1375-1381.
- Jacob-Dubuisson, F., R. Fernandez & L. Coutte, (2004) Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 235-257.
- Jacob-Dubuisson, F., J. Guerin, S. Baelen & B. Clantin, (2013) Two-partner secretion: as simple as it sounds? *Res Microbiol* **164**: 583-595.
- Jacob-Dubuisson, F., C. Locht & R. Antoine, (2001) Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol Microbiol* **40**: 306-313.
- Jacob-Dubuisson, F., V. Villeret, B. Clantin, A. S. Delattre & N. Saint, (2009) First structural insights into the TpsB/Omp85 superfamily. *Biol Chem* **390**: 675-684.
- Jeschke, G., V. Chechik, P. Ionita, A. Godt, H. Zimmermann, J. Banham, C. Timmel, D. Hilger & H. Jung, (2006) DeerAnalysis2006 - A Comprehensive Software Package for Analyzing Pulsed ELDOR Data *Appl. Magn. Reson.* **30**: 473-498.
- Jeschke, G., A. Koch, U. Jonas & A. Godt, (2002) Direct Conversion of EPR Dipolar Time Evolution Data to Distance Distributions. *J. Magnet Reson* **155**: 72-82.
- Jong, W. S., C. M. ten Hagen-Jongman, T. den Blaauwen, D. Jan Slotboom, J. R. Tame, D. Wickstrom, J. W. de Gier, B. R. Otto & J. Lührink, (2007) Limited tolerance towards folded elements during secretion of the autotransporter Hbp. *Mol Microbiol* **63**: 1524-1536.
- Kajava, A. V., N. Cheng, R. Cleaver, M. Kessel, M. N. Simon, E. Willery, F. Jacob-Dubuisson, C. Locht & A. C. Steven, (2001) Beta-helix model for the filamentous

haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins. **42**: 279-292.

McHaourab, H. S., M. A. Lietzow, K. Hideg & W. L. Hubbell, (1996) Motion of spin-labeled side chains in T4 lysozyme. Correlation with protein structure and dynamics. *Biochemistry* **35**: 7692-7704.

Méli, A. C., H. Hodak, B. Clantin, C. Locht, G. Molle, F. Jacob-Dubuisson & N. Saint, (2006) Channel properties of TpsB transporter FhaC point to two functional domains with a C-terminal protein-conducting pore. *J Biol Chem* **281**: 158-166.

Noinaj, N., A. J. Kuszak, J. C. Gumbart, P. Lukacik, H. Chang, N. C. Easley, T. Lithgow & S. K. Buchanan, (2013) Structural insight into the biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature* **501**: 385-390.

Polyhach, Y., E. Bordignon & G. Jeschke, (2011) Rotamer libraries of spin labelled cysteines for protein studies. *Phys Chem Chem Phys* **13**: 2356–2366.

Rice, A. J., F. J. Alvarez, K. M. Schultz, C. S. Klug, A. L. Davidson & H. W. Pinkett, (2013) EPR spectroscopy of MolB2C2-a reveals mechanism of transport for a bacterial type II molybdate importer. *J Biol Chem* **288**: 21228-21235.

Rigel, N. W., J. Schwalm, D. P. Ricci & T. J. Silhavy, (2012) BamE modulates the *Escherichia coli* beta-barrel assembly machine component BamA. *J Bacteriol* **194**: 1002-1008.

Seelig, J., (1970) Spin label studies of oriented smectic crystals, a model system for lipid bilayers. *J Am Chem Soc* **92**: 3881-3887.

Sen, K.I., T.M. Logan & P.G. Fajer (2007) Protein dynamics and monomer-monomer interactions in AntR activation by electron paramagnetic resonance and double electron-electron resonance. *Biochemistry* **46**: 11639-11649.

Stegmeier, J. F. & C. Andersen, (2006) Characterization of pores formed by YaeT (Omp85) from *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)* **140**: 275-283.

Stoll, S. & A. Schweiger, (2006) EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J. Magn. Reson.* **178** 42-55

Tikhonov, Y. & V. Arsenin, (1977) *Solutions of Ill-posed Problems*. John Wiley & Sons, New York.

van Ulsen, P., S. Rahman, W. Jong, M. Daleke-Schermerhorn & J. Lührink, (2013) Type V secretion: from biogenesis to biotechnology. *Biochem Biophys Acta* **in press**.

Figure legends

Figure 1. FhaC structure and positions of the EPR probe. A cutaway view of FhaC is presented with the R1 positions in red. H1 is shown in green, L6 in cyan and the POTRA domains in purple. The linker is shown as a dashed line. The pairs of residues used for PELDOR experiments are joined by stippled lines with arrows. The image was created with PyMOL.

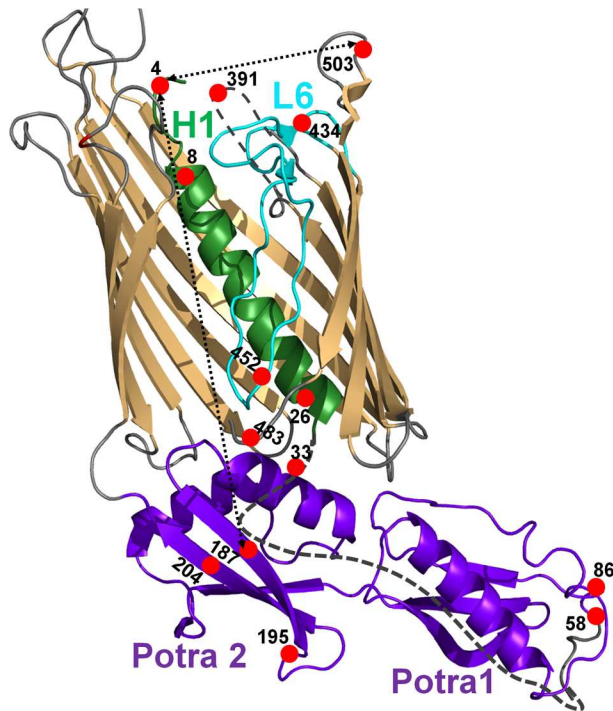


Figure 2. CW EPR analyses. Normalized spectra of FhaC variants alone (blue) or mixed with Fha30_{N66I} (red). The experiments were performed with FhaC in SUVs, except for FhaC4-R1 (dtg), which was in detergent. The first peak is enlarged (inset). The arrowheads and asterisks indicate rigid and fast components, respectively. The magnetic field is in Gauss.

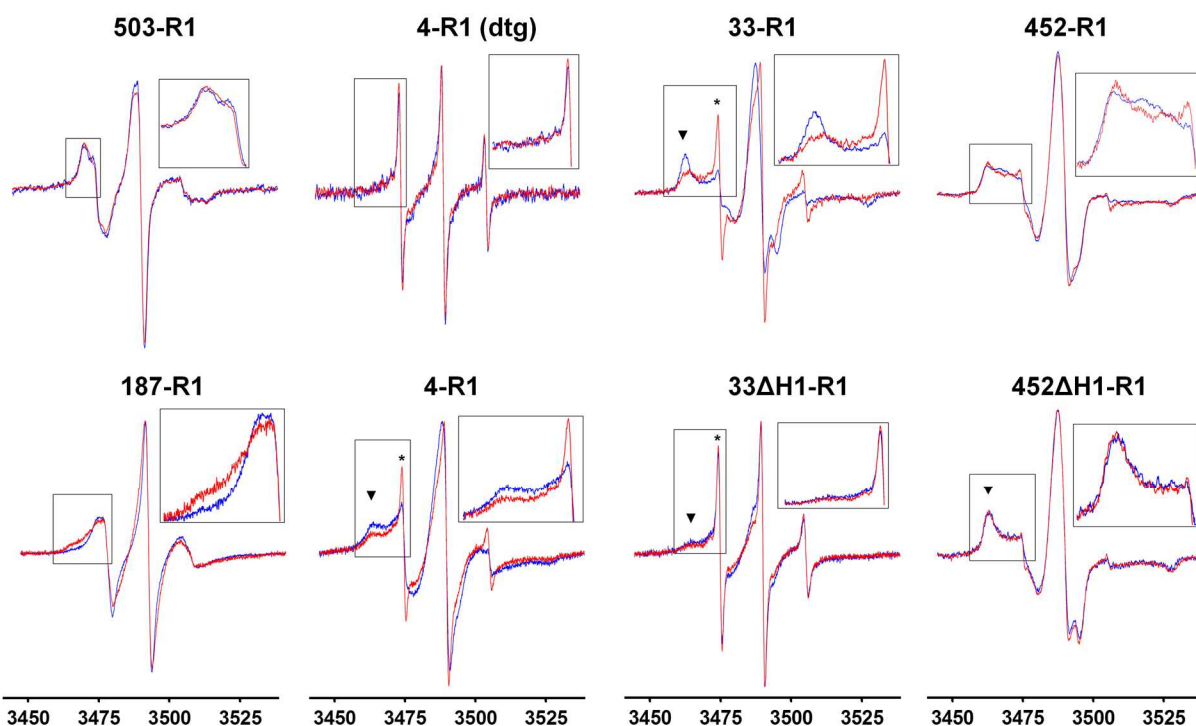


Figure 3. PELDOR analyses. Dipolar evolution after background subtraction (top panels) and distance distribution (middle panels) for FhaC_{4-R1+503-R1} (A) and FhaC_{4-R1+187-R1} (B) in SUVs, alone (left panels) or with Fha30_{N66I} (right panels). In the bottom panel, schematic representations of FhaC conformations that account for the distances discussed in the text are provided. The red dots indicate the positions of the spin label. Only one conformation is presented in each case, which does not take into account all the distances and the possible MTSL rotamers. In B, the distances that correspond to the X-ray conformation of FhaC (Fig. 4) are too large to be measured in our system.

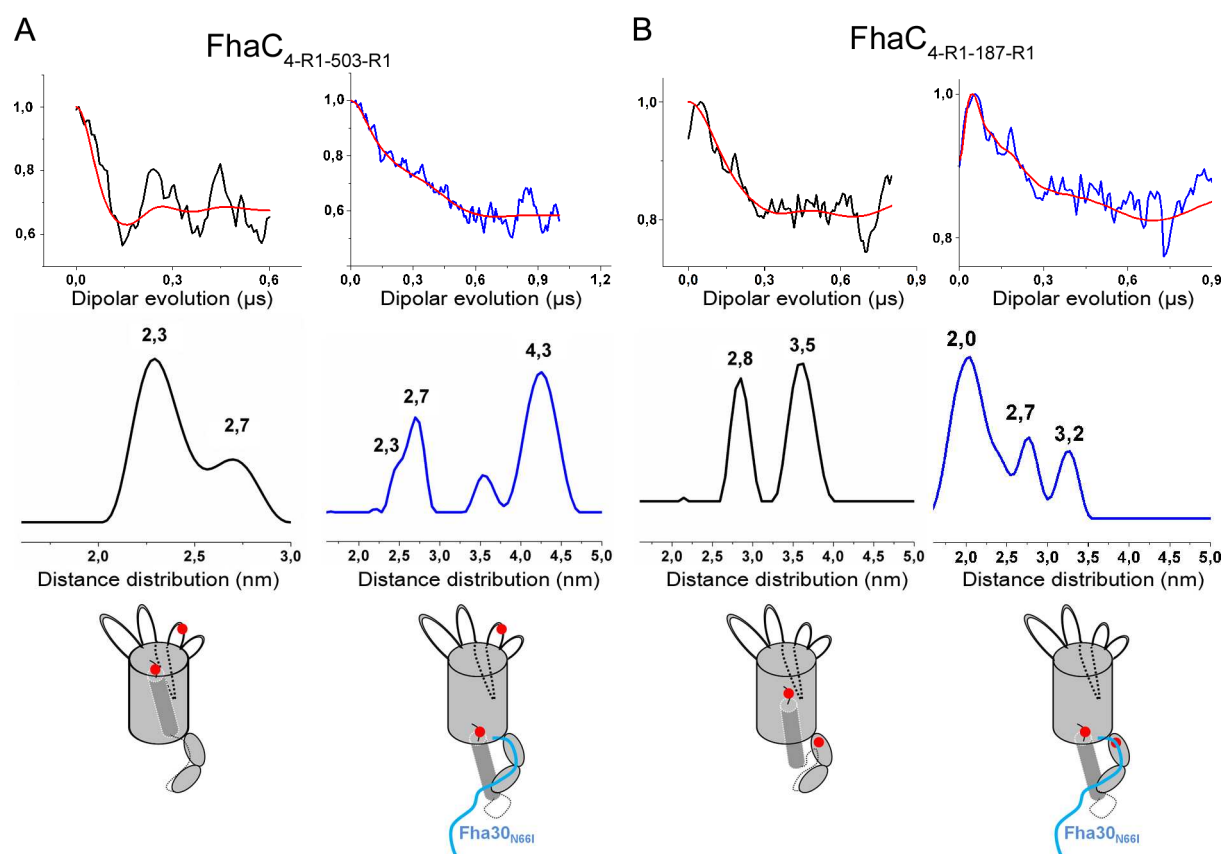


Figure 4. Distance simulations. Nitroxide-nitroxide distances were simulated with the MMM software taking into account the rotamers of the MTSL-derivatized cysteines. The 2qdz pdb file was first modified by substituting the residues at positions 4 and 503 or 4 and 187 with cysteines using Pymol. A, FhaC_{4-R1+503-R1} and B, FhaC_{4-R1+187-R1}.

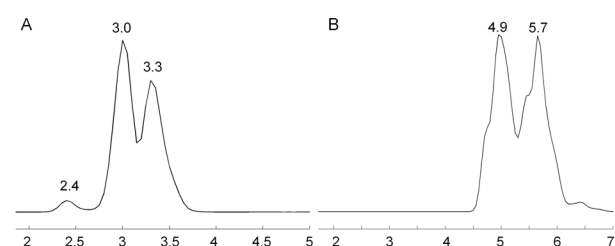
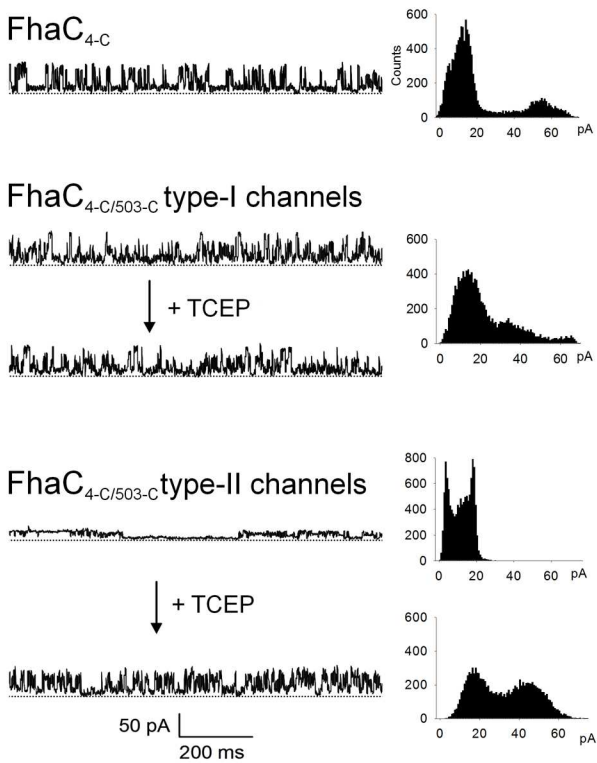


Figure 5. Electrophysiology analyses of FhaC variants. Selected recordings of single-channel activity of FhaC_{4-Cys} and FhaC_{4-Cys+503-Cys} at +40 mV and room temperature and the associated amplitude histograms of 3-seconds single-channel recordings are presented. Where indicated, TCEP was added to 4 mM. The stippled lines represent the zero-current level. The

627 conductance sublevels for FhaC_{4-Cys+503-Cys} type I channels are likely due to Cys₅₀₃ perturbing
 628 the pore environment.



629
 630 **Figure 6. *In vivo* localization of H1 probed by spontaneous S-S bond formation.** A, FhaC
 631 variants harbouring the indicated Cys substitutions were detected by immunoblotting of
 632 cellular extracts with anti-FhaC antibodies. The arrows indicate DTT-sensitive species with
 633 an aberrant migration because of an intra-molecular S-S bond. WT represents wild type,
 634 cysteine-less FhaC. B, FhaC variants were produced in *E. coli* JCB571 (*dsbA*⁻) or its isogenic
 635 parent JCB570. FhaC_{4-Cys} was used as a control. No reducing agent was added to the sample
 636 buffer.

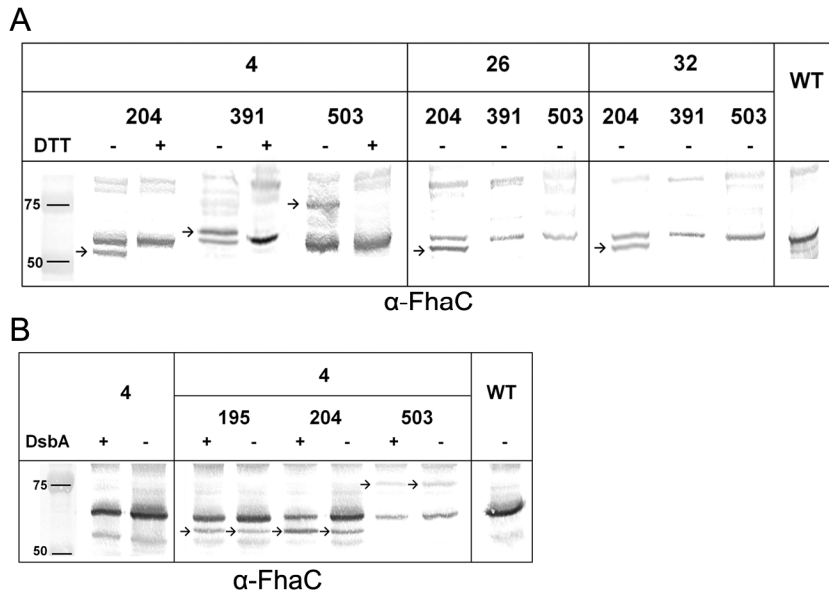


Figure 7. *In vivo* localization of H1 probed by specific labelling. A, flow cytometry analyses of *E. coli* expressing FhaC_{3-myc} alone or with Fha30 or the Fha30-BugE chimera, or expressing myc-tagged Fha30-BugE alone or with untagged FhaC. A specific FITC-conjugated antibody was used to detect the myc epitope at the N terminus of FhaC. B, covalent labeling of FhaC_{8-Cys} with PEG-MAL (5K) in cells expressing FhaC_{8-Cys} alone or with Fha30-BugE. The arrowhead indicates an FhaC-containing species that migrates at the size expected for a dimer. The asterisk represents another FhaC-containing species, most likely an S-S bonded adduct between FhaC and an unidentified periplasmic protein. The blot was probed with anti-FhaC antibodies.

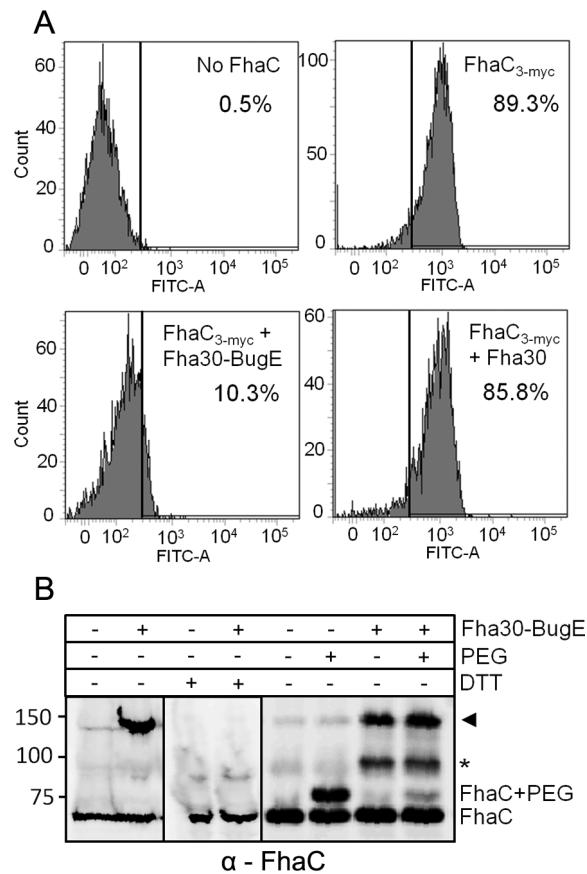


Figure 8. Characterization of the Fha30-BugE chimera stalled in FhaC. A, schematic representation of the proteins used for this analysis. The TPS domain is hatched. B, immunoblots of culture supernatants (s) and cell lysates (c) of UT5600(pFc3, pBBItac138b) co-producing FhaC and Fha30 and of UT5600(pFc3, pBBItac141b) coproducing FhaC and Fha30-BugE. In the lanes marked 'NI', the expression of Fha30 or Fha30-BugE was not induced. The supernatant and the cell lysate of non-induced cultures were loaded in the 'NI' lanes as controls for the expression of Fha30 and Fha30-BugE, respectively. The blots were developed using an anti-Fha30 antibody. C, immunoblots of cell extracts showing the expression of the chimera over time, with t=0 representing the time of IPTG addition to induce the expression of Fha30-BugE with a myc epitope at the N or at the C terminus. The blots were probed with an anti-Fha30 antibody. D and E, flow cytometry analyses showing cell surface labelling with an anti-myc FITC conjugate of *E. coli* that co-produces FhaC with Fha30-BugE_{myc-Nter} but not with Fha30-BugE_{myc-Cter}.

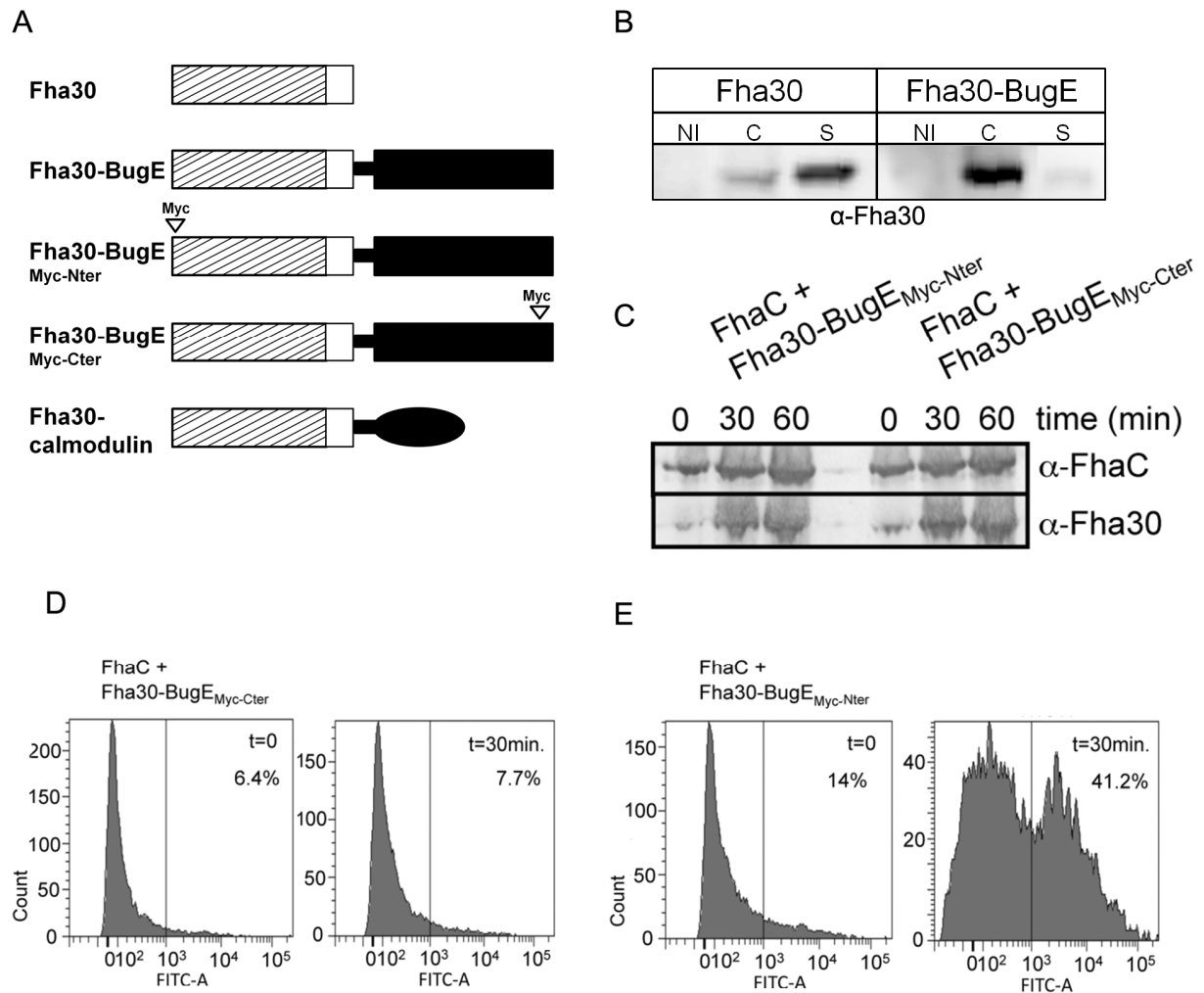


Figure 9. N-terminal sequences of representative TpsB proteins. The signal peptide has been removed. The sequences predicted to form α helices corresponding to H1 of FhaC are boxed in black. The start of POTRA1 is delineated by an open red box. Note the poor conservation of the linker region and the abundance of Pro residues. In HMW1B, POTRA1 directly follows the signal-peptide and thus no H1 and linker are present, which appears to be unusual among TpsB proteins. The black arrow indicates the position of a Cys residue in several TpsB proteins also harbouring another Cys residue located in POTRA1. Based on the FhaC structure, formation of S-S bond between these two residues is likely, thus constraining the C-terminal part of the linker. These 2 Cys residues correspond to Thr₅₈ and Pro₈₈ in FhaC. Note that the residues at these two positions were shown by direct coupling analysis to have co-evolved in the TpsB family (Dwyer *et al.*, 2013).

673

..QLLPGARDLNRIDDRQRKEQLQRDIERALTRPPVELNPQSE...AAAPARKPDATSGHTVTVHAMD L FhaC
 ETLPD SHMMQDMSMGESRRALQDSTREVNQLIEQRRYQQLKQQR...LLAEPAAPALPQSAQC LPIAGVYL ShlB
 ...APPFWDNTPDSESRRALQNSAREVNSLLEQQSLQRLEKQRQARPSAAAPQLREDTSC LPIIDGVYL EthB
 ...NETGNLGSISERRRALQDSQREINQLIEQNRYQQLQIEKA...VNISPTPTLITESEHCLPIKGVYI HpmB
 ...EPENIVITKFEFVQYQYDIKHQAQKN...TIDFSPSKVC LPYKGIKF HdhB
 ...ASLNPAERSEIQQRQSEVIEQSRQREALQQLN...DIAQAPLKADNAPQGPF TLRD IIRF HecB
 ...APVLQNAAGSLGNQLRQEE SRSVHIPELAAPDVAS...SAETAQPF RDAS SER VILKH IIRL EtpB
 ...AAVYVPNAGQAMRDIAQATQPALPEQPAPELDLPAPK...PSAPAQAPDTSGIR LQVND FVI PFL_1466
 ...LGQPD TGSLNRELEQRRIQPEAKPSGE LFNQ...AAKSPYTAQYKQELK FPLTQVQI HxuB
 ...EEA FLVKGFQL Hmw1B

674

Supporting information

Conformational dynamics of protein transporter FhaC:

large-scale motions of plug helix

Jérémy Guérin^{1,2,3,4}, Catherine Baud^{1,2,3,4}, Nadia Touati⁵, Nathalie Saint⁶, Eve Willery^{1,2,3,4},
Camille Locht^{1,2,3,4}, Hervé Vezin^{5*}, Françoise Jacob-Dubuisson^{1,2,3,4*}

¹ Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity, Lille, France

² CNRS UMR8204, Lille, France

³ INSERM U1019, Lille, France

⁴ Univ Lille Nord de France, 59019 Lille, France

⁵ CNRS UMR8516, Villeneuve d'Ascq, France

⁶ INSERM U1046, CHU A. de Villeneuve, Montpellier cedex 05

* for correspondence : francoise.jacob@ibl.fr; herve.vezin@univ-lille1.fr

running title: conformational dynamics of FhaC

keywords: protein dynamics/ outer membrane/ two-partner secretion/ Omp85 superfamily/

electron paramagnetic resonance

Figure S1. CW EPR spectra of FhaC variants. The spectra were recorded with FhaC in detergent (dtg) or in SUVs. The spectrum of cysteine-less FhaC (WT) in the first panel shows the absence of non-specific labelling. The other spectra are those of the indicated FhaC variants in the absence (blue) or in the presence (red) of the Fha30_{N66I} substrate. A control is shown with a non-relevant protein, GB1-BctE, added to FhaC_{33-R1} (black square). The blue and green spectra are those of FhaC_{33-R1} alone or after the addition of GB1-BctE, respectively. The magnetic field is in Gauss.

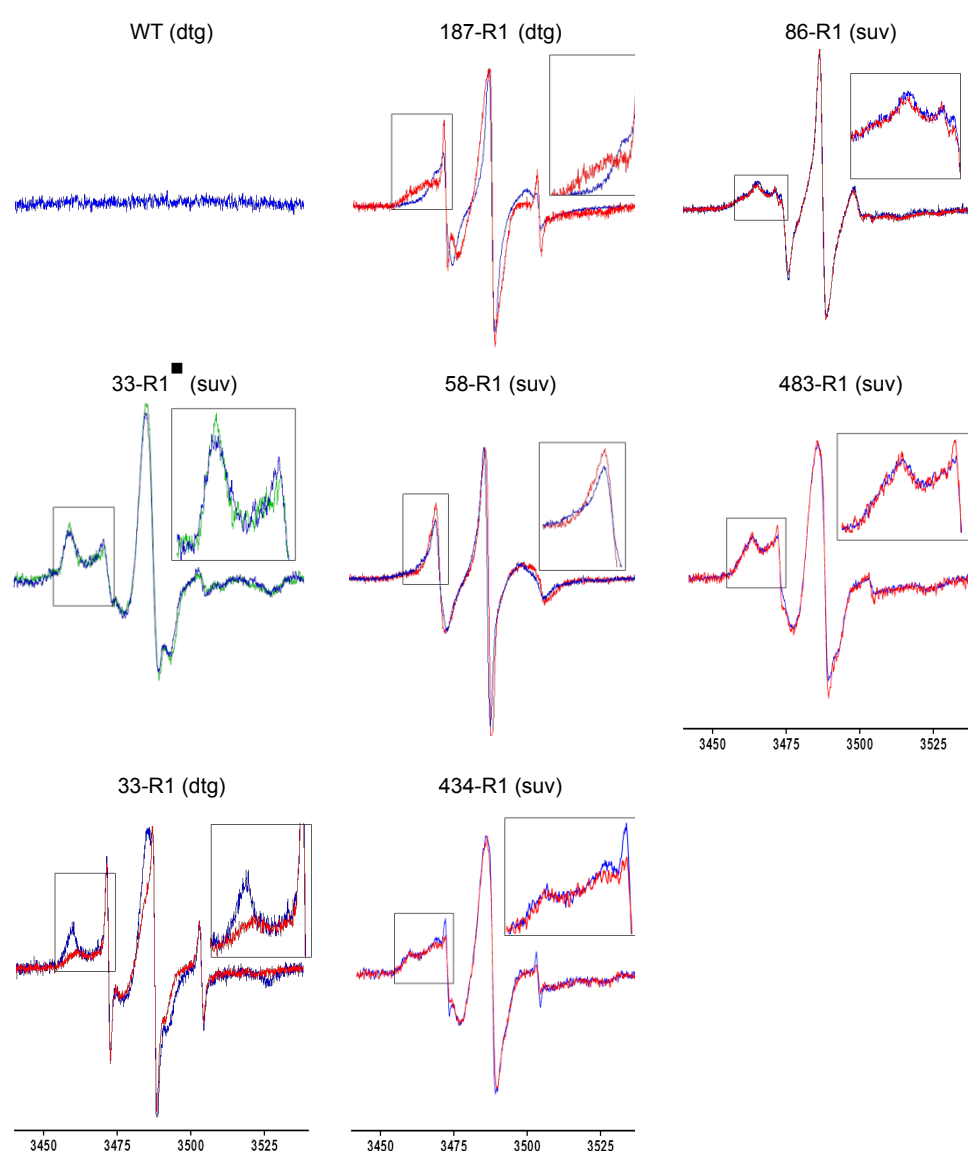


Figure S2. Simulations of CW-EPR spectra. Selected spectra shown in Fig. 1 were simulated with EasySpin using Chili. The colour code is as in Fig. 1, with FhaC alone or

mixed with the Fha30_{N66I} substrate in blue and red, respectively. The black lines show the simulated spectra. The correlation time and the order parameter were determined for the fast and slow components of the spectra, respectively. The occupancy of each state is given in %.

FhaC_{452-R1} and FhaCAH1_{452-R1} could not be simulated, because they contain a distribution of low-mobility regime components.

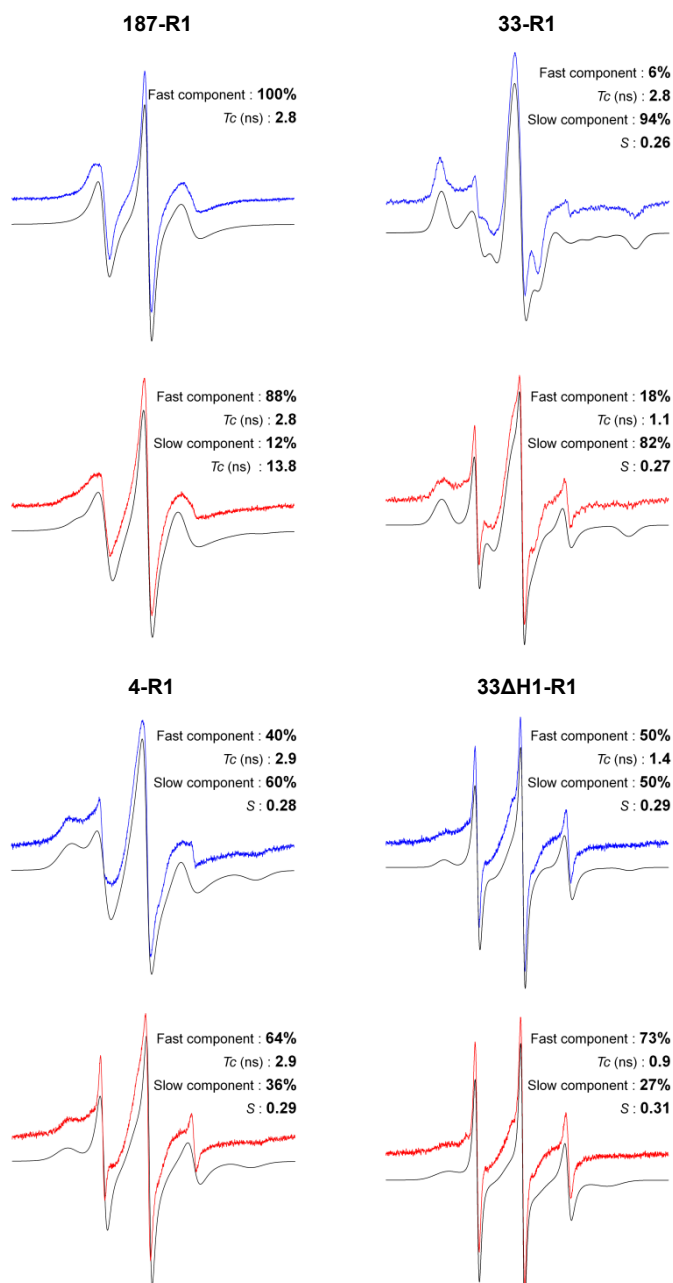


Figure S3. Control PELDOR experiment. The echo decay of single-label FhaC_{503-Cys} was recorded. No oscillations were observed, showing the absence of inter-molecular spin interactions.

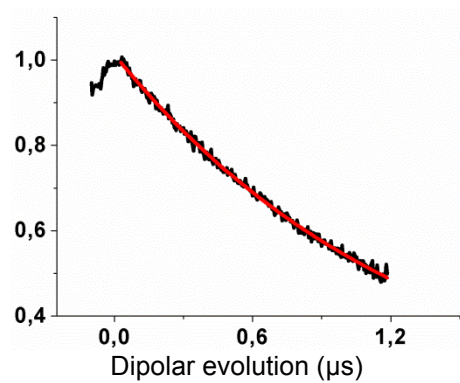


Figure S4. Spontaneous S-S bond formation in FhaC. A, positions of the Cys residues used for these analyses. B, immunoblot showing spontaneous S-S bond formation between the indicated Cys residues of FhaC. The arrows indicate forms that are sensitive to DTT.

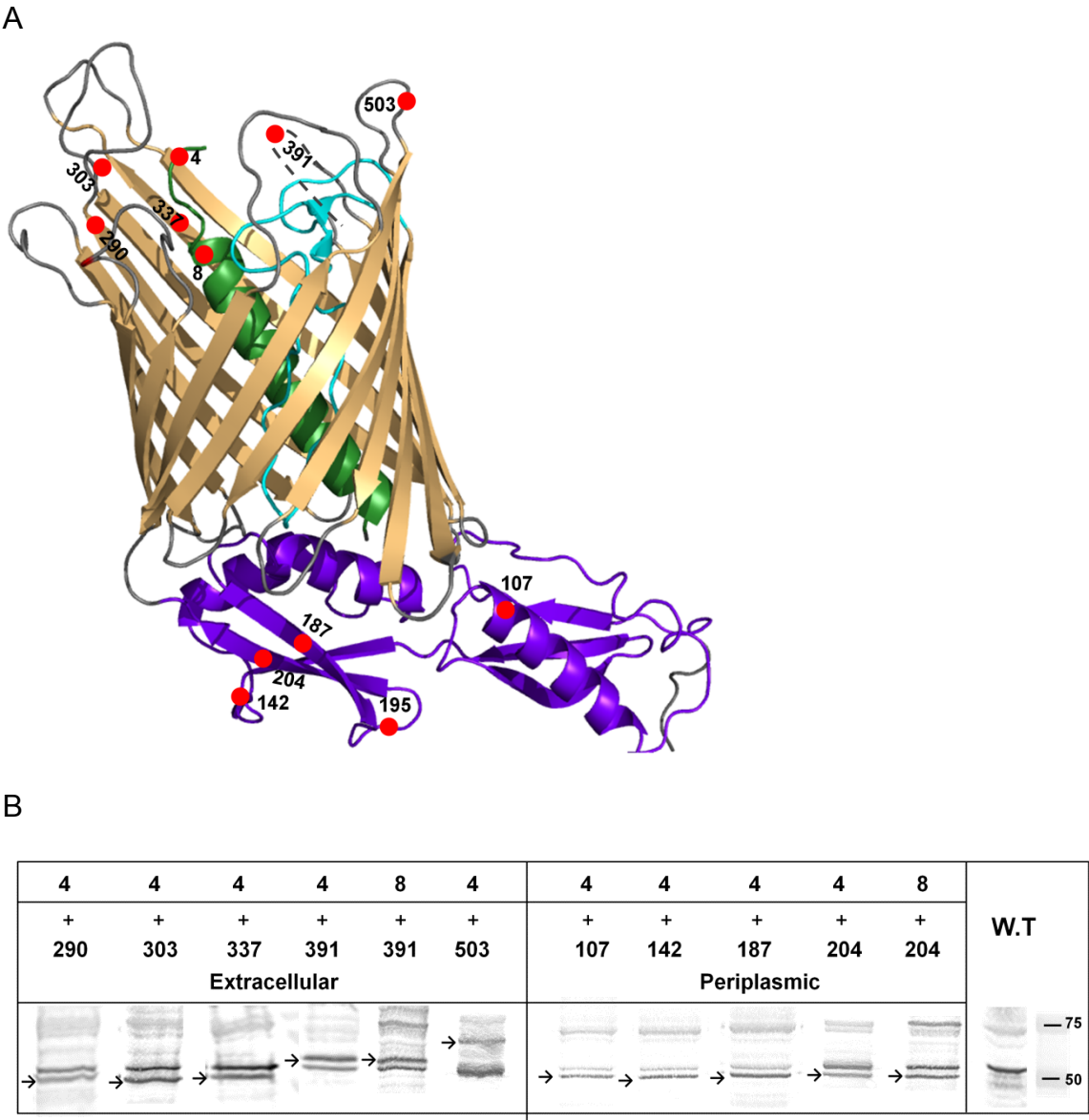


Figure S5. Cytogram patterns of the flow cytometry analyses presented in Fig. 7. The solid lines represent the selected window set to detect the % of fluorescent cells. The details of the data used for analysis are also presented.

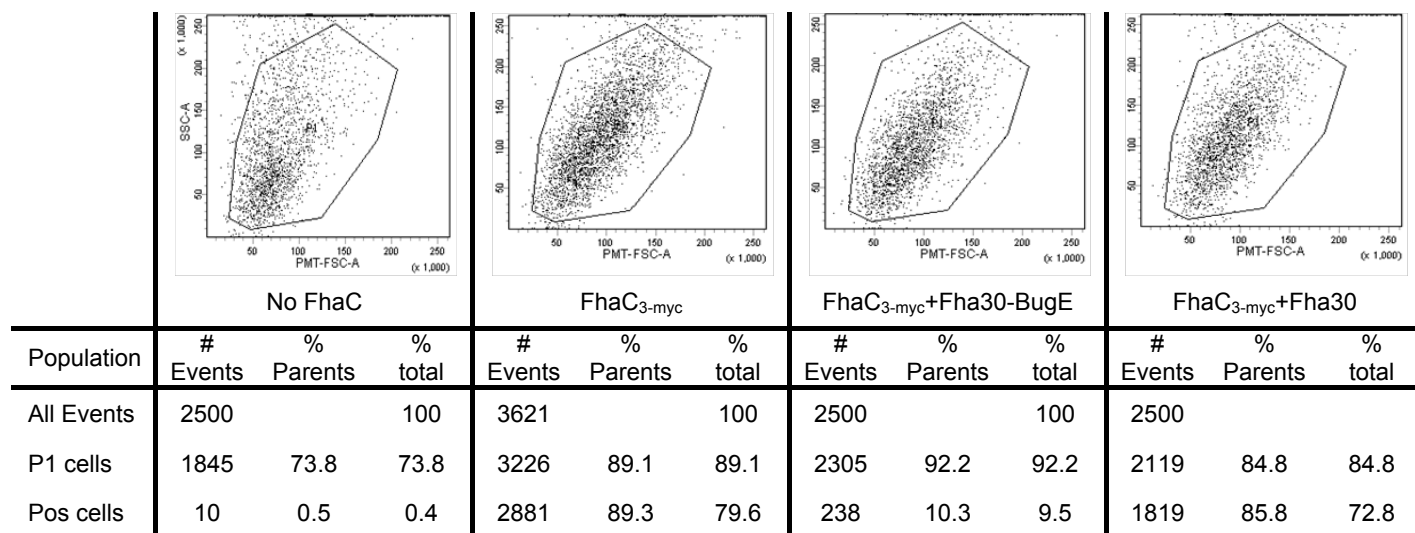


Figure S6. Cytogram patterns of the flow cytometry analyses presented in Fig. 8. The solid lines represent the selected window set to detect the % of fluorescent cells. The details of the data used for analysis are also presented.

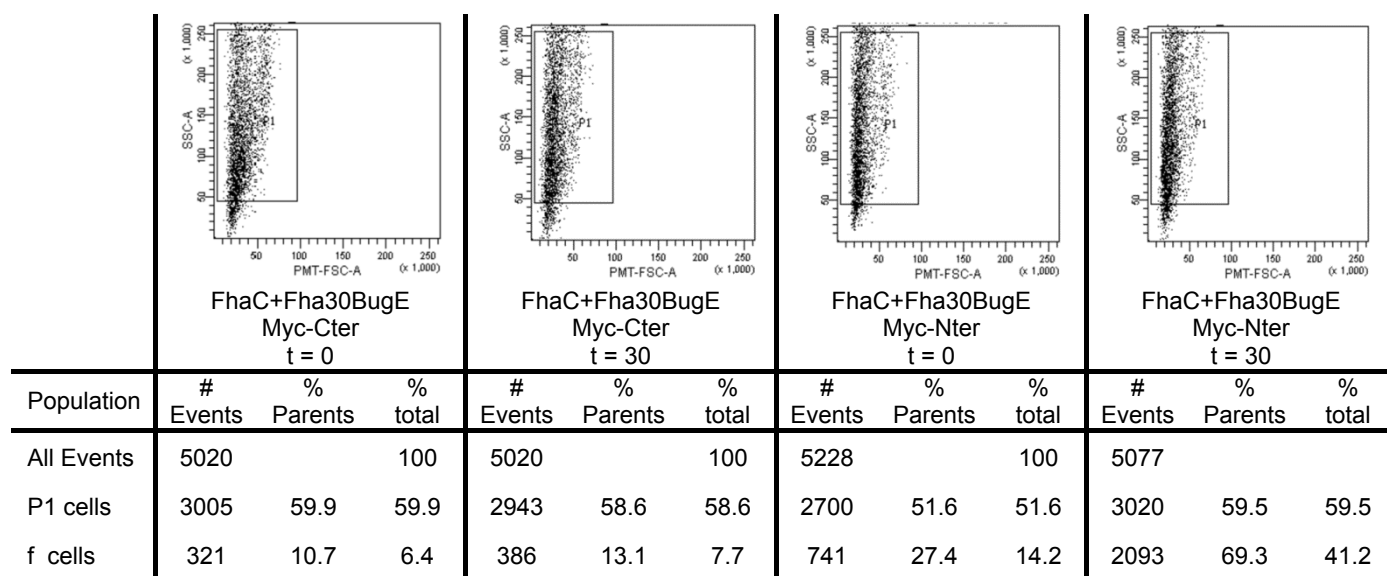
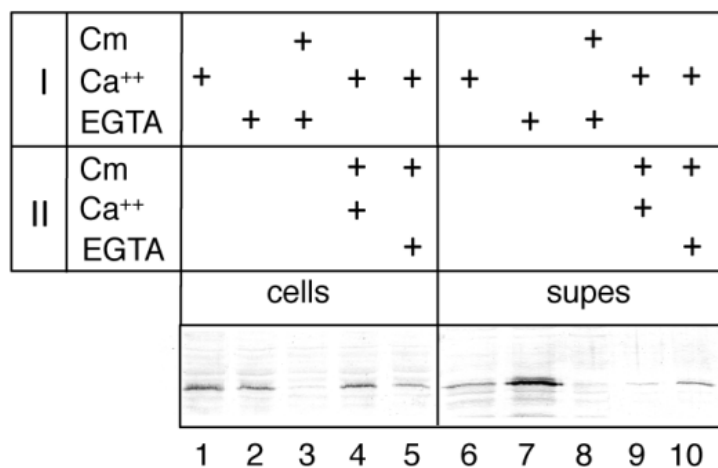


Figure S7. A stalled chimera mimics a secretion intermediate. Immunoblots of cell extracts and supernatants of *E. coli* co-expressing the Fha30-calmodulin chimera and FhaC were developed using an anti-Fha30 antibody. Conditions (I) were applied for the first period of time, and conditions (II) were applied to cultures #4 and #5 for a second period of time after washing the cells. Lower amounts of the chimera were cell-associated when EGTA was present in the culture medium than when Ca^{++} was present (lanes 1 and 2), and the opposite was observed for the chimera secreted into the milieu (lanes 6 and 7). The addition of chloramphenicol prevented chimera synthesis (lanes 3 and 8). When the cells were first grown with Ca^{++} and then with chloramphenicol and Ca^{++} or EGTA, the stalled chimera was released more efficiently with EGTA than with Ca^{++} (lanes 9,10). Thus, the stalled Fha30-calmodulin could be induced to complete secretion when its cargo was unfolded. Note that we used Fha30-BugE rather than Fha30-calmo for the experiments shown in Fig. 7, because Fha30-calmodulin was more leaky and susceptible to intracellular proteolysis than the other.



➤ *Conclusions sur l'Hélice H1:*

Dans cet article, nous nous sommes intéressés à la dynamique conformationnelle de FhaC, en nous focalisant plus particulièrement sur l'hélice α N-terminale. Ainsi grâce à l'utilisation de différentes techniques de biochimie et de biophysique nous avons caractérisé la sortie de cette hélice en dehors du pore. La Résonance Paramagnétique Electronique nous a permis d'étudier la mobilité des éléments structuraux présents à l'intérieur du pore dans la vue cristallographique (Hélice H1 et boucle L6). Dans ces expériences nous avons constaté que seule l'hélice et le linker subissaient un changement de conformation lors de la reconnaissance avec le substrat, ce qui suggère qu'à cette étape de la sécrétion, seule l'hélice H1 pourrait sortir du pore. Nous avons caractérisé ce changement par RPE impulsionnelle en triangulant la position N-terminale de l'hélice, et avons constaté qu'il correspond au déplacement de H1 à proximité des domaines Potra. Ensuite, lors d'expériences *in vivo* nous avons utilisé la cytométrie en flux associée à l'utilisation d'une chimère de Fha30. Cette dernière possède un domaine globulaire C-terminal qui empêche son relargage dans le milieu extérieur. Durant ces expériences, nous avons observé que cette hélice H1 n'était pas non plus présente dans le pore lorsque le substrat était en cours de sécrétion. Ces différents résultats suggèrent donc que l'hélice H1 est bien en dehors du pore durant tout le processus de sécrétion. En étudiant son déplacement, nous nous sommes rendu compte que H1 et le linker devaient être extrêmement dynamiques même en l'absence de la FHA, puisque nous avons détecté la présence de ponts disulfures intramoléculaires entre le N-terminus de H1 et différentes cystéines positionnées dans la structure (boucles extracellulaires et domaines POTRA). Par ailleurs, l'utilisation d'un de ces variants en électrophysiologie nous a permis de contrôler que le déplacement de cette hélice entraînait bien une ouverture du canal. Ainsi dans une population de FhaC, il semblerait donc qu'il existe un équilibre conformationnel de H1, et que la présence de la FHA déplacerait cet équilibre. Le rôle de cette hélice dans la conformation au repos serait donc de limiter la diffusion à travers le pore en servant de « bouchon ».

L'analyse des séquences des transporteurs TpsB révèle que pratiquement tous possèdent une région N-terminale de type Hélice-Linker avant les domaines POTRA. Nous pouvons donc supposer que nos résultats sur FhaC sont extrapolables aux autres TpsB, et que le rôle et le fonctionnement de cette hélice et du linker qui la suit soient similaires. Pour le cas de HMW1B qui ne possède pas cette région N-terminale, il a été proposé que la partie C-terminale de son partenaire TpsA (HMW1A) puisse remplacer la fonction de bouchon de l'hélice H1. Il pourrait ainsi s'agir d'une différence évolutive puisque dans ce cas HMW1A n'est pas relâché dans le milieu extérieur, mais reste associé à la membrane grâce à un petit domaine C-terminal périplasmique stabilisé par un pont disulfure entre 2 cystéines. Ainsi pontée l'extrémité C-terminale du substrat forme un petit domaine plus globulaire qui resterait dans le périplasme, et le segment qui la précède traverserait la membrane par l'intérieur de HMW1B, empêchant HMW1A d'être relâché dans le milieu extérieur (Buscher et al., 2006). D'autres protéines TpsA possèdent 2 cystéines proches dans leur portion C-terminale, suggérant qu'elles puissent se comporter comme HMW1A (Buscher et al., 2006). Il y aurait donc deux façons de limiter la perméabilité du pore formé dans la membrane externe par un transporteur TpsB.

Lors de sa parution dans le journal *Molecular Microbiology*, notre article a été mis à l'honneur par un « microCommentary » rédigé par Nicholas Noinaj et Susan Buchanan, qui ont récemment publié les structures de BamA. Dans leur commentaire, ils résument nos résultats en symbolisant la sortie de l'hélice comme une révérence que ferait FhaC à FHA lors d'un menuet : **FhaC takes a bow to FHA in the two-partner do-si-do.**



Dingo (Personnage de Disney®) faisant une révérence

4. Rôle du Linker

Le linker qui relie H1 au Potra1, n'a pas pu être défini dans la structure cristallographique initiale de FhaC (Clantin et al., 2007). La délétion de l'hélice H1 ne perturbe pas la fonction de la protéine, mais affecte la quantité de FhaC produite dans la membrane (Méli et al., 2006), ce qui laisse supposer que H1 stabilise la protéine. En revanche, la délétion supplémentaire du Linker rend FhaC inactif (Guédin, 2000). Ceci semble donc indiquer un rôle fonctionnel de ce dernier lors de la sécrétion. Dans la famille TpsB, la séquence et la taille du linker ne sont toutefois pas conservées, bien qu'il s'agisse toujours d'une région riche en prolines (Guérin et al., 2014). Par exemple dans le cas de FhaC, le linker se compose de 26 acides aminés, dont 5 prolines et 5 alanines. Avec sa richesse en prolines et le fait qu'il ne diffracte pas aux rayons X, nous avons donc suggéré que le linker devait correspondre à une région peu structurée et mobile de la protéine.

a) Analyse de sa mobilité par RPE

Durant ma thèse, j'ai donc d'analysé sa mobilité en plaçant des sondes paramagnétiques à différentes positions de sa séquence (32, 33, 47, 48, 58) (Fig. 32). De manière étrange, peu de positions ont pu être marquées, comme si elles étaient inaccessibles au solvant. Ainsi seulement 2 variants de FhaC portant une Cys en positions N-

terminale et C-terminale du linker (respectivement dans les positions 33 et 58) ont pu être analysés.

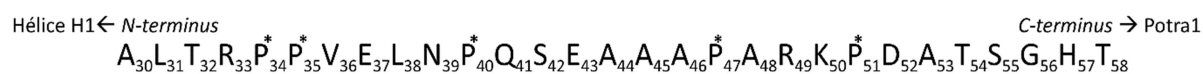


Figure 32 : Séquence du linker de FhaC reliant l'hélice H1 et le domaine Potra1. Les prolines sont indiquées d'un astérisque. Le linker commence au résidu 33 et se termine par le résidu 58.

Comme nous l'avons vu dans le papier, la sonde placée en position 58 correspond à un spectre RPE « simple », avec un régime de mobilité assez rapide (avec un T_c de l'ordre de la nanoseconde) (Fig. 33D). L'ajout du substrat - qui correspond à Fha30 sous forme dépliée - ne modifie pas l'aspect du spectre, et la position conserve le même régime de mobilité. Ceci signifie que la présence du substrat n'entraîne pas de changement conformationnel important en position 58. (Fig. 33D ; Fig. 34 ; Annexe 3)

FhaC avec un marqueur de spin placé en position 33 montre un spectre plus complexe, car composite. Il comprend au moins 2 composantes, l'une majoritaire correspondant à une mobilité lente ($T_c \approx 10^{-7}$ seconde), et l'autre plus minoritaire correspondant à une mobilité plus rapide ($T_c \approx 10^{-9}$ seconde) (Fig. 33AB). Un tel ralentissement de la sonde est très surprenant pour une expérience réalisée à température ambiante et sur une position située dans une région prédite non structurée de la protéine. De plus ces 2 composantes, lente et rapide, sont présentes, en proportions légèrement différentes, pour la protéine en détergent ou réincorporée en liposomes. Ceci suggère que le linker possède au moins 2 conformations différentes avec des mobilités bien distinctes quel que soit l'environnement de FhaC (détergent ou membrane lipidique). L'ajout du substrat entraîne un changement spectral dans lequel la proportion de la population en mobilité rapide double alors que la proportion de la population en composante plus lente devient moins représentée (Fig. 33AB, Annexe 3). On aurait pu s'attendre à ce que la conformation contrainte soit résolue aux rayons X. Notre interprétation que la structure est désordonnée à cet endroit n'est sans doute pas correcte (voir ci-dessous, structure corrigée).

Comme expliqué dans l'introduction sur la RPE, diverses caractéristiques d'un spectre RPE sont utilisables pour comparer des spectres entre eux. Nous avons choisi ici, par exemple, d'utiliser l'inverse de la largeur de la raie centrale qui, pour rappel, s'élargit en fonction du ralentissement. Par conséquent plus la mobilité sera lente, plus la valeur de l'inverse de la largeur de raie sera petite. Ainsi en utilisant ce paramètre sur la position 33, nous pouvons constater le changement de conformation induit par le substrat (Fig. 34). Ceci vient confirmer qu'en présence de la FHA, la position 33 du linker devient moins rigide.

En revanche l'absence de l'hélice H1, supprimée génétiquement dans un mutant de FhaC, permet à la position 33 d'être beaucoup plus mobile, caractérisée par un spectre RPE de type rapide (Fig. 33C) avec une largeur de raie centrale bien plus fine (Fig. 34). La présence de la composante lente plus minoritaire (représente environ 25% du spectre) suggère que les 2 conformations existent encore, mais que sans l'hélice H1, le linker est majoritairement moins contraint.

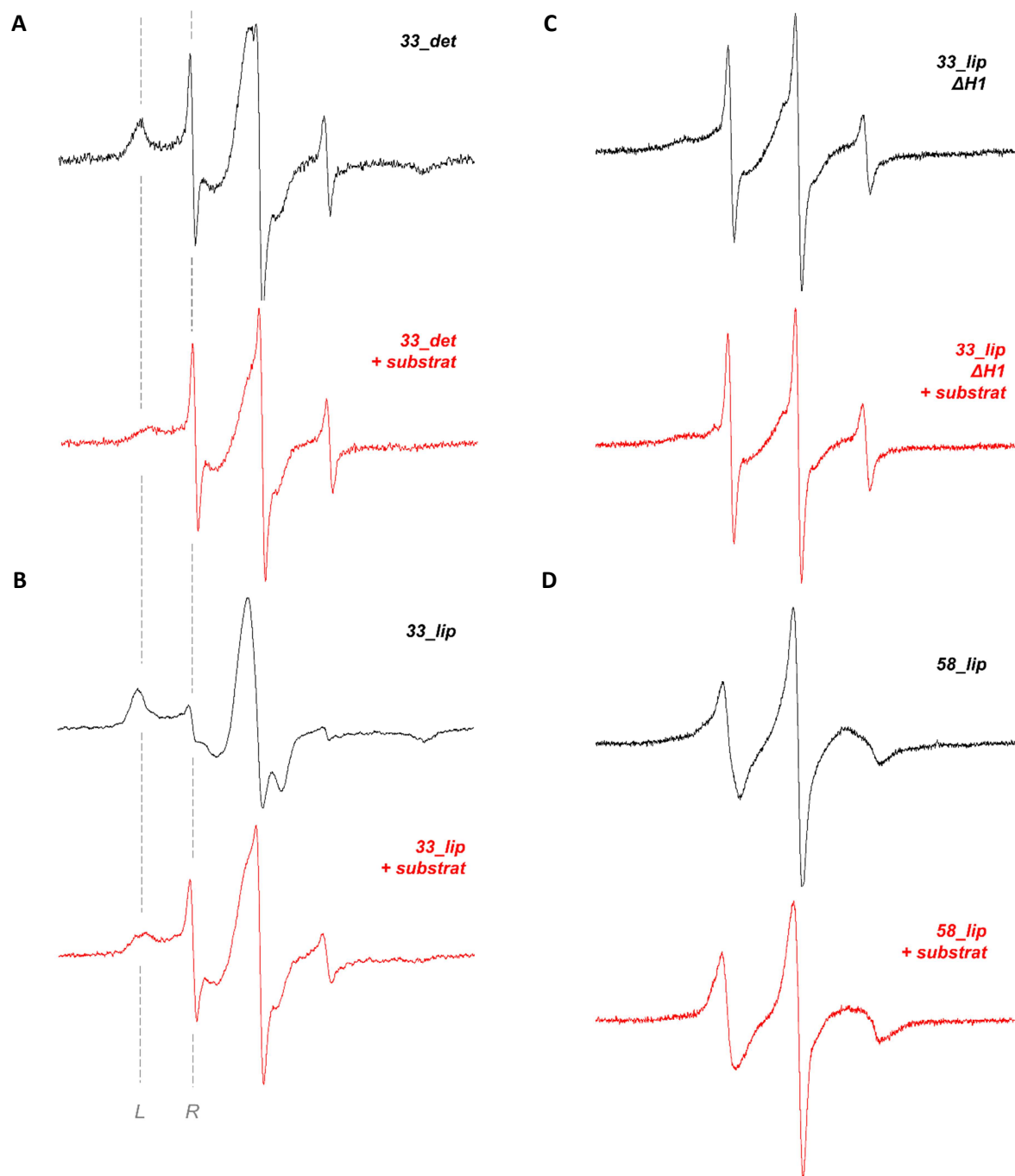


Figure 33 : Spectres RPE enregistrés à température ambiante de FhaC portant une sonde de spin en position 33 ou 58 du linker, avec amplitudes normalisées. A, position 33 avec FhaC en micelle de détergent (= _det ; forme dans laquelle FhaC a été cristallisée). Tous les autres spectres correspondent à FhaC réintégré en protéoliposomes (= _lip). B, position 33. C, position 33 dans un mutant de FhaC dans lequel l'hélice H1 est retirée génétiquement. D, position 58. En noir : FhaC seul. En rouge : FhaC avec ajout du substrat (Fha30_{N66I}). Les lignes en pointillées aident à guider l'œil pour suivre les composantes de mobilité lente (L) et rapide (R).

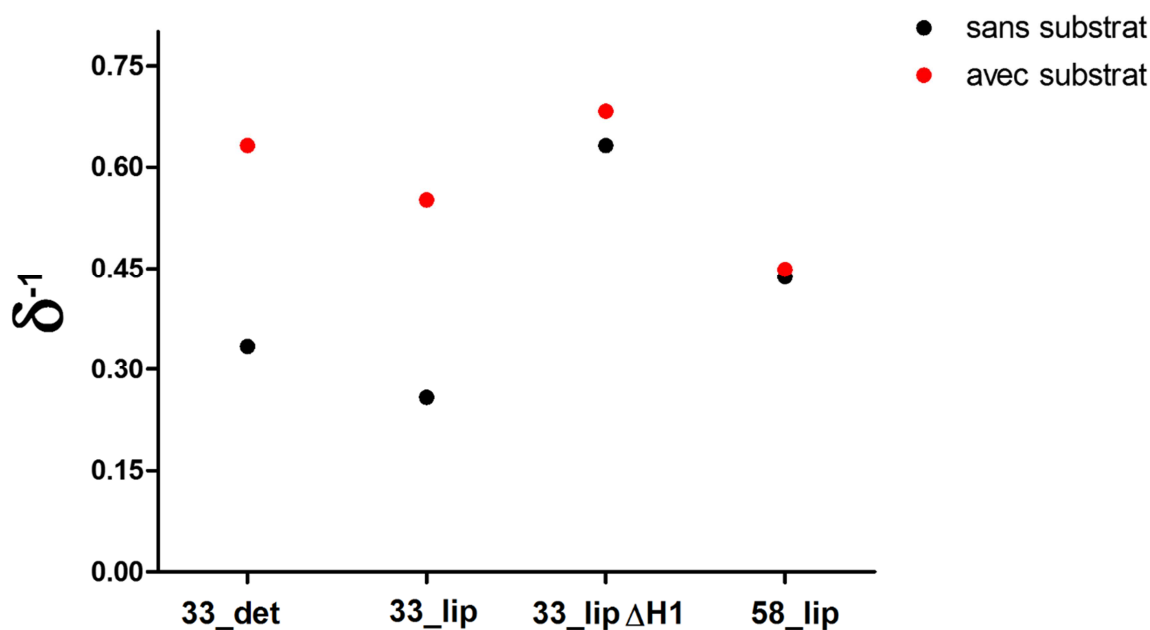


Figure 34 : Analyse de l'inverse de la largeur de raie centrale (δ^{-1}) des spectres RPE ci-dessus.

En conclusion, nous avons ainsi proposé dans l'article que le linker soit en interaction tertiaire avec certaines surfaces des domaines POTRA et contraint dans cette conformation par l'hélice présente dans le pore. Au moment où l'hélice est sortie du pore, le linker est plus éloigné des domaines POTRA, il devient ainsi plus mobile. La présence du domaine TPS qui est en contact avec les domaines POTRA doit donc empêcher le linker de reprendre sa place et par la même occasion empêcher l'hélice de revenir dans le pore.

Très prochainement, une nouvelle structure d'un mutant de FhaC va être publiée. Avec une meilleure résolution (2,6 Å) que sur la structure de 2007 (3,15 Å), le linker a pu être défini. Ainsi, nous pouvons voir qu'il existe un réseau d'interactions entre R33 et les résidus Q174 et D173 de l'hélice H4 du POTRA2 (Fig. 35). Ceci vient donc confirmer nos résultats de RPE : dans la conformation 'fermée', la position 33 est stabilisée par ces interactions, qui doivent donc être rompues lors de la sortie de H1 en dehors du canal. Par ailleurs, le résidu D173 dans H4 qui est aussi en interaction avec le résidu R320 de la 3ème boucle périplasmique avait déjà été identifié pour son importance dans la fonctionnalité de FhaC. Sa mutation en alanine, empêche la sécrétion du substrat sans nuire à la reconnaissance du domaine TPS (Delattre et al., 2011). Il semble donc que les interactions entre le linker, le Potra2 et le tonneau sont importantes pour la fonction.

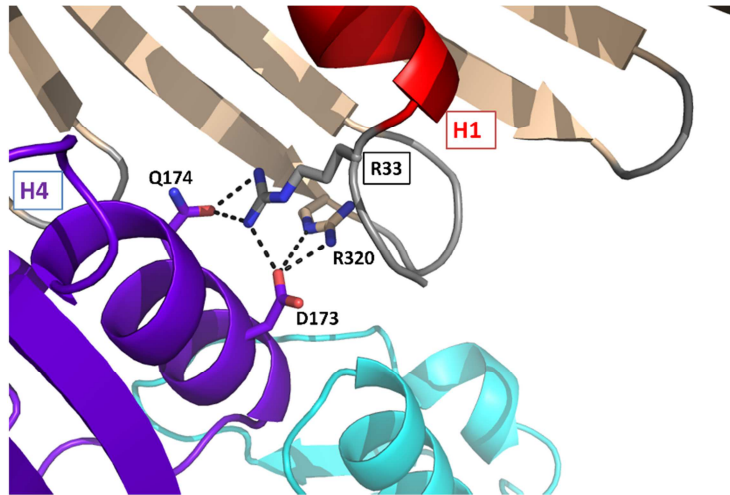


Figure 35 : Représentation de la structure à meilleure résolution du mutant FhaC dans laquelle le linker a été défini. Nous pouvons voir en position 33 un réseau d'interactions avec des résidus du Potra2.

b) Caractérisation de la fonction du linker pour la sécrétion

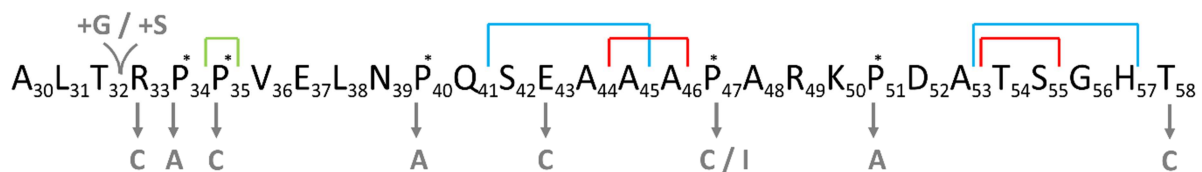


Figure 36 : Représentation des mutations réalisées sur la séquence du linker de FhaC. Des délétions de 1, 2 à 4 acides aminés sont indiquées (Vert, Rouge et Bleu, respectivement). La substitution (flèche) ou l'insertion (+) de résidus sont affichées en gris. Les prolines sont marquées d'un astérisque.

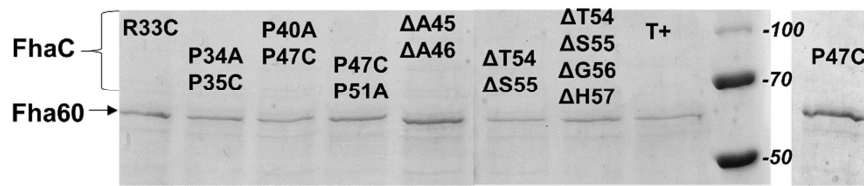
Comme dit précédemment, les séquences des linkers des transporteurs TpsB ne sont pas conservées. Elles sont toutefois toutes riches en proline, mais leur nombre et localisation peuvent différer. Grâce à des résultats préliminaires, nous savons que la délétion de la totalité du linker ou l'insertion simultanée de deux résidus, Glycine et Serine, avant la position 33 empêchent la sécrétion de la FHA (Guedin, 2000). Afin de caractériser sa fonction, nous avons introduit plusieurs mutations dans le linker pour tester leur effet sur la sécrétion du substrat. Ainsi nous nous sommes concentrés principalement sur le remplacement des prolines par des cystéines ou alanines (la mutation en cystéine me permettant de les utiliser pour la RPE au besoin). Par ailleurs, nous avons introduit aussi des petites délétions de 2 à 4 acides aminés dans deux régions différentes du linker et inséré une glycine ou une sérine avant la position 33 (Fig. 36).

Pour caractériser l'activité de sécrétion de ces variants de FhaC, nous avons utilisé principalement 2 formes tronquées de la FHA, l'une de 60 kDa et l'autre de 80 kDa chez *E. coli*. Pour des mutations réalisées sur les prolines, nous avons aussi testé ces mutants de FhaC chez *B. pertussis*, avec la forme complète de la FHA (Fig. 37). Dans nos tests de sécrétion, nous savons que certaines mutations effectuées sur FhaC peuvent avoir des effets

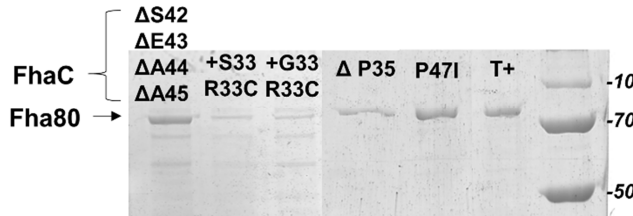
moins marqués si l'on utilise comme substrat modèle la forme la plus courte (Fha30) au lieu de formes plus grandes, ce qui suggère que l'intégrité fonctionnelle de FhaC est d'autant plus importante que son substrat s'allonge. C'est la raison pour laquelle il est préférable si l'on veut déceler des défauts fonctionnels mineurs de FhaC, de réaliser un test de sécrétion avec des formes plus longues que la forme de 30 kDa portant essentiellement le domaine TPS. Il est possible que la cinétique de sécrétion varie selon les régions du substrat. FhaC pourrait par exemple intervenir dans le processus de repliement de la FHA à différentes étapes, et notamment au-delà du repliement initial du domaine TPS, qui est indispensable pour la suite du processus de sécrétion.

L'ensemble de ces tests de sécrétion ont été réalisés plusieurs fois en faisant à chaque fois le rapport entre la quantité de substrat sécrété dans le milieu extérieur et la quantité de FhaC intégré dans les membranes, comme vu précédemment (Fig. 32). Pour beaucoup de mutations du linker, nous avons constaté une grande variabilité dans ces tests de sécrétion (principalement avec le substrat de 80 kDa). Ceci pourrait suggérer que FhaC adopte plusieurs conformations différentes en présence de ces mutations et que l'équilibre entre ces formes soit moins dynamique que dans la protéine sauvage. Cette mauvaise reproductibilité nous empêche malheureusement de faire une analyse précise et quantitative. Toutefois certaines tendances ressortent. Ainsi aucune mutation du linker n'a affecté la production et la quantité de FhaC retrouvée dans les membranes, qui est identique au contrôle sauvage. L'analyse du test de sécrétion présenté dans la figure ci-dessous (Fig. 37) peut se faire de manière relative en comparant la sécrétion des mutants de FhaC à la sécrétion de FhaC sauvage (T+). Nous pouvons constater qu'aucune mutation n'a complètement aboli la fonction de sécrétion de FhaC, sauf l'insertion d'un seul résidu (glycine ou sérine) avant la position 33, qui affecte drastiquement la quantité de substrat retrouvé dans le milieu extracellulaire (Fig. 37A). De manière assez générale, des mutations dans des positions N-terminales du linker ($\Delta P35$; P34A P35C) ont un effet plus délétère sur la sécrétion que celles plus loin dans le linker. Au contraire, des mutations dans la partie centrale du linker (P40A P47C ; $\Delta A45\Delta A46$; $\Delta S42\Delta E43\Delta A44\Delta A45$) ont tendance à légèrement augmenter la quantité de protéine sécrétée (Fig. 37AB). Le cas de la position 47 est très surprenant : de façon reproductible, dans les tests de sécrétion, les mutations (cystéine ou isoleucine) en cette position provoquent une augmentation de la sécrétion d'un facteur > 2 , avec les deux substrats testés (80 kDa et 60 kDa). Le test de sécrétion réalisé chez *B. pertussis* avec le mutant P47CP51A montre aussi une très légère augmentation de la quantité de FHA sécrétée (Fig. 37C). Toutefois ce dernier test n'a été réalisé qu'une seule fois, faute de temps, et donc aucune conclusion forte ne peut en être tirée. Des mutations réalisées dans la région C-terminale du linker ($\Delta T54\Delta S55$; $\Delta T54\Delta S55\Delta G56\Delta H57$; T58C) n'affectent pas l'efficacité de sécrétion, suggérant que ces résidus ne sont pas importants pour la fonction de la protéine.

A



B



C

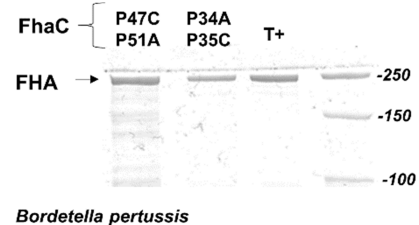


Figure 37 : Exemples de tests de sécrétion réalisés sur des mutants du linker. Les surnageants de cultures sont déposés sur gel SDS-Page avec coloration au bleu de Coomassie. A, Sécrétion de Fha60 et B, Fha80 chez *E. coli*. C, surnageant de culture de *B. pertussis* avec la forme complète de la FHA. Puisque ces mutations n'ont pas affecté la quantité de FhaC présente dans les membranes (identique au T+), nous pouvons analyser directement la quantité de protéine sécrétée dans le milieu extérieur.

➤ Conclusion sur le linker :

La fonction précise du linker reste à comprendre. Même si sa présence est indispensable, et certaines mutations que nous y avons introduites affectent la sécrétion de la FHA plus ou moins fortement, nous ne savons toujours pas à quelle(s) étape(s) du processus de sécrétion il intervient. Il est très intrigant que des délétions modérées n'aient pas ou peu d'effet sur l'activité de FhaC. La longueur du linker n'est donc pas critique, ce qui indique qu'il n'est pas complètement 'tendu' lorsque H1 est dans le pore.

En revanche sa partie N-terminale localisée juste après l'hélice α H1 semble la plus importante. Les expériences de RPE ont montré que la position 33 correspondait à une région très rigide, et la nouvelle structure X confirme que le résidu R33 du linker est en contact tertiaire avec des résidus du domaine Potra2 (D173 et Q174). Cette même position devient plus mobile en présence du substrat, ce qui est couplé avec la sortie de l'hélice H1, ce que nous avons pu détecter par RPE pulsée. Cette région du linker est par ailleurs la plus sensible aux mutations, suggérant qu'en la modifiant on pourrait affecter le mécanisme d'ouverture du canal. De manière surprenante, bien que les résidus proline soient nombreux dans la séquence du linker, leur remplacement n'a pas affecté drastiquement la sécrétion du substrat, sauf celui de la proline en position 47 qui semble plutôt augmenter l'efficacité de sécrétion. En plus de cette proline, plusieurs mutations introduites dans cette région centrale du linker ont mis en évidence un phénotype semblable, avec une meilleure efficacité de sécrétion. Ainsi le rôle de cette région pourrait être de moduler la cinétique de sécrétion, peut-être pour donner le temps à la FHA d'acquérir une bonne structure lors de son repliement, principalement pour la région C-terminale de la protéine complète, qui n'est pas structurée en hélice β . Malheureusement la sonde paramagnétique n'a pu être fixée en aucune position dans la partie centrale du linker, donc nous n'avons aucune donnée sur la

mobilité du linker à ces positions. Toutefois, nous pourrions coupler des mutations de la région centrale à une Cystéine en position 33 ou dans l'hélice N-terminale H1 (en position 4) et regarder si ces substitutions affectent la mobilité du début du linker ou de l'hélice H1. En effet il n'est pas exclu que ces mutations puissent favoriser l'ouverture du canal et donc permettre au substrat une reconnaissance initiale plus rapide par exemple. Le C terminus du linker se situe juste avant le domaine Potra1, et semble être la partie du linker la moins importante pour la fonction, puisqu'elle ne subit pas de changement de mobilité en présence du substrat et que des mutations n'altèrent pas la capacité de sécrétion de FhaC. L'analyse des séquences d'autres transporteurs TpsB (ShlB, EthB, HpmB...) a montré qu'à la position correspondant au résidu 58 de FhaC on trouve dans ces autres protéines une cystéine qui pourrait former un pont disulfure avec une seconde cystéine conservée présente dans le Potra1 de ces mêmes transporteurs. Par conséquent, ainsi pontée l'extrémité C-terminale du linker serait plutôt contrainte et ne pourrait pas subir de changement conformationnel important lors de l'interaction avec le TpsA associé. Bien que ces deux résidus Cys soient remplacés par une thréonine et une proline dans FhaC, nos résultats suggèrent que la partie C-terminale du linker n'est pas impliquée dans les interactions avec le substrat ou dans les changements conformationnels que ces interactions occasionnent. Ces résidus Thr et Pro de FhaC sont proches l'un de l'autre dans la structure de la protéine.

5. Rôle de la boucle L6

Cette boucle qui relie les brins β_{11} et β_{12} possède à son extrémité une tétrade VRGY/F qui est un des éléments les plus conservées et indispensables à la superfamille Omp85 (Fig. 38) (Jacob-Dubuisson et al., 2009 ; Leonard-Rivera and Misra, 2012; Delattre et al., 2010). Dans les différentes structures cristallographiques de BamA et TamA, cette boucle rentre jusqu'à mi-hauteur à l'intérieur du tonneau β (Noinaj et al., 2013 ; Gruss et al., 2013). L'arginine de la tétrade est en interaction avec un acide aspartique présent sur le motif F/GxDxG du brin β_{13} lui aussi conservée dans la superfamille (Fig. 38). Sur la base de ces structures récentes, nous avons revu notre structure datant de 2007 et avons découvert que cette même interaction était aussi présente chez FhaC (Fig. 39).

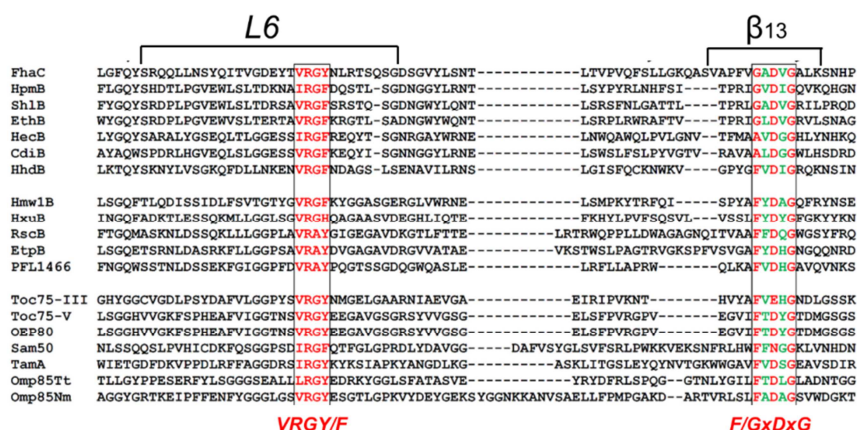


Figure 38 : Alignement des séquences de FhaC et d'autres membres de la superfamille Omp85/TpsB. Les motifs très conservés sont indiqués en rouge. Les séquences correspondant à la boucle L6 et au brin β_{13} de FhaC sont représentées. Adapté de Jacob-Dubuisson et al., 2013. Omp85 (Nm et Tt) représente BamA chez ces deux espèces.

a) Analyse de sa mobilité par RPE

Afin de déterminer les changements conformationnels que L6 subirait lors de l'interaction avec le substrat, nous avons caractérisé la mobilité de cette boucle par RPE. Pour cela nous avons marqué cette boucle au MTSL en 2 positions. La position 434 correspond à une position extracellulaire, située à la base de la boucle L6, et la position 452 est le dernier résidu de la tétrade conservée (Fig. 39). Avant de choisir cette dernière position, nous savions qu'à la différence de l'arginine 450, le remplacement de la tyrosine 452 n'entraînait pas de perte de fonction (Fig. 40).

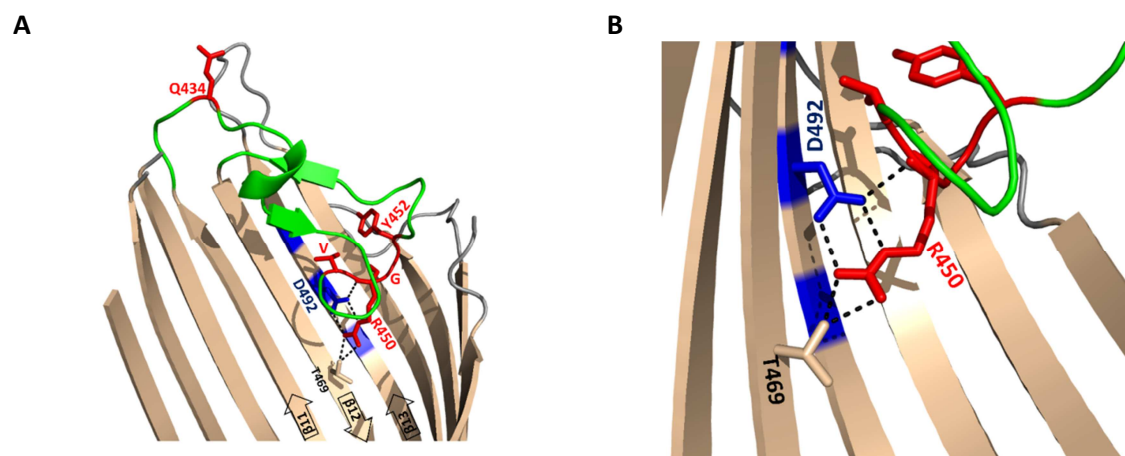


Figure 39 : Représentation cristallographique de l'organisation structurale de la boucle L6 de FhaC. A, L6 est représentée en vert ; Au sein de L6 le motif VR₄₅₀GY₄₅₂ est indiqué en rouge. Le second motif GxD₄₉₂xG présent sur le brin β13 est indiqué en bleu. La position Y₄₅₂ et la position Q₄₃₄ correspondent aux 2 résidus remplacés par des cystéines pour le marquage avec le MTSL. B, vue rapprochée centrée sur la position R₄₅₀ stabilisée par D₄₉₂ et T₄₆₉.

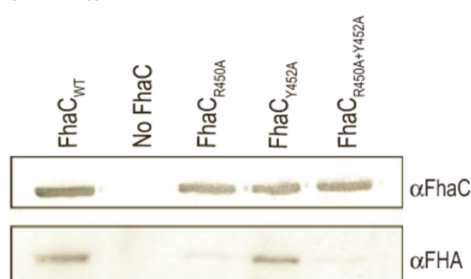


Figure 40 : Détection par immuno-blot de la présence de FhaC et de FHA (Fha80) lors d'un test de sécrétion, (Delattre et al., 2010).

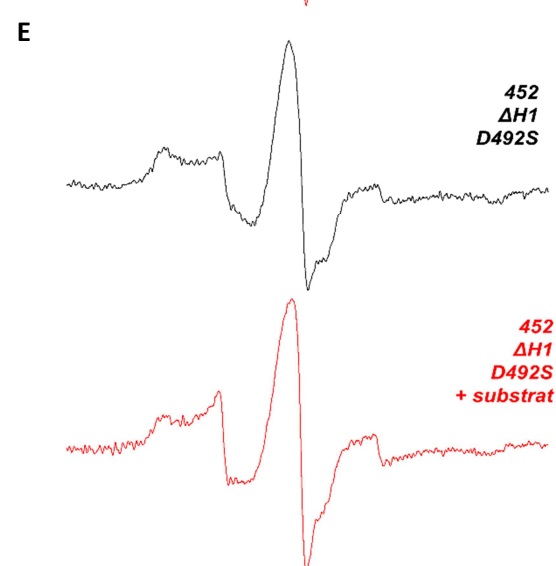
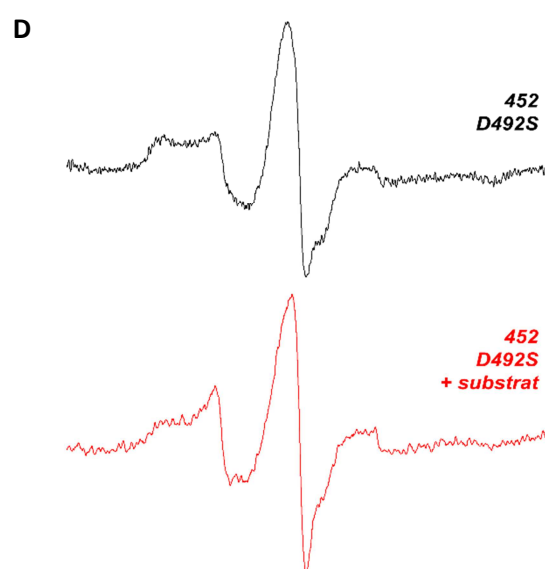
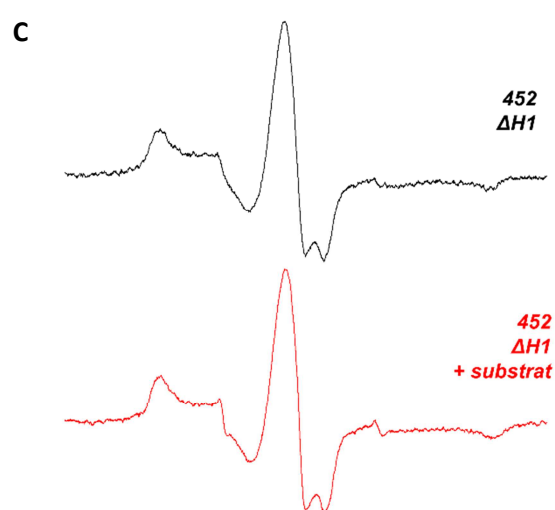
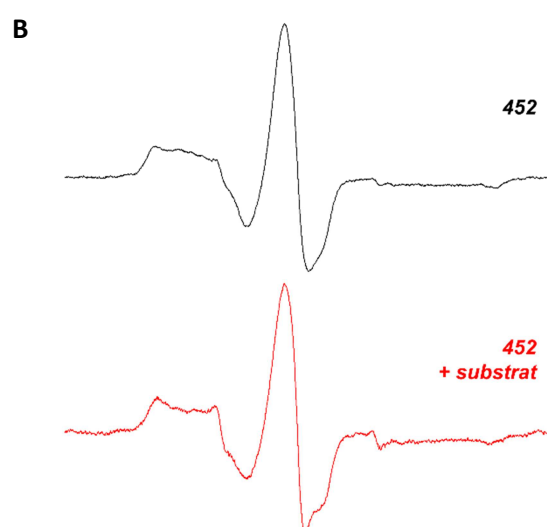
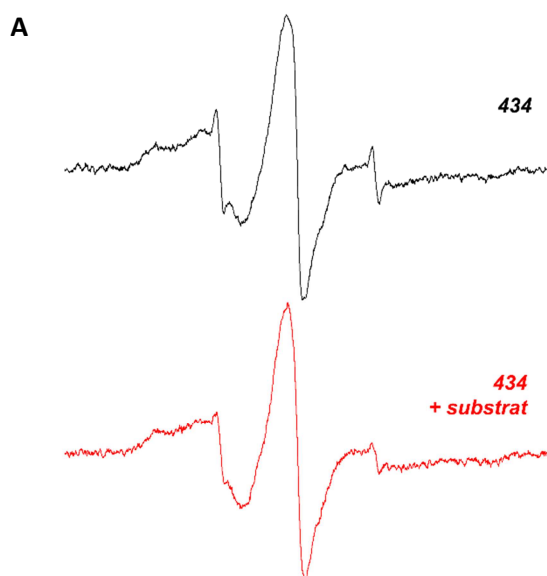


Figure 41 : Spectres RPE enregistrés à température ambiante de FhaC en protéoliposomes et marqué en positions 434 ou 452 de L6, avec amplitudes normalisées. A, position 434 B, position 452. C, position 452 dans un mutant de FhaC sans l'hélice H1. D, position 452 dans un variant de FhaC portant la mutation D492S. E, même mutant sans l'hélice H1.

En noir : FhaC seul. En rouge : FhaC avec ajout du substrat (Fha30_{N66I}).

L'analyse de la mobilité de cette boucle L6 est assez complexe. Les spectres RPE des positions 434 et 452 montrent tous les deux plusieurs composantes correspondant à une large gamme de mobilités différentes. Ils ont été simulés pour déterminer le nombre de composantes majeures et caractériser la mobilité de la sonde associée à chaque composante spectrale (voir Annexe 3). En effet ces spectres sont caractérisés par une première raie spectrale mal définie (Fig. 41AB). Toutefois les proportions de ces composantes ne sont pas les mêmes entre ces 2 positions. La position 434 semble un peu moins contrainte puisque les valeurs T_c de ses composantes de mobilité sont plus faibles que pour la position 452 qui serait plus rigide (Fig. 41B, Annexe 3). Ceci est aussi montré par l'analyse des valeurs correspondant à l'inverse de la largeur de raie centrale (Fig. 42).

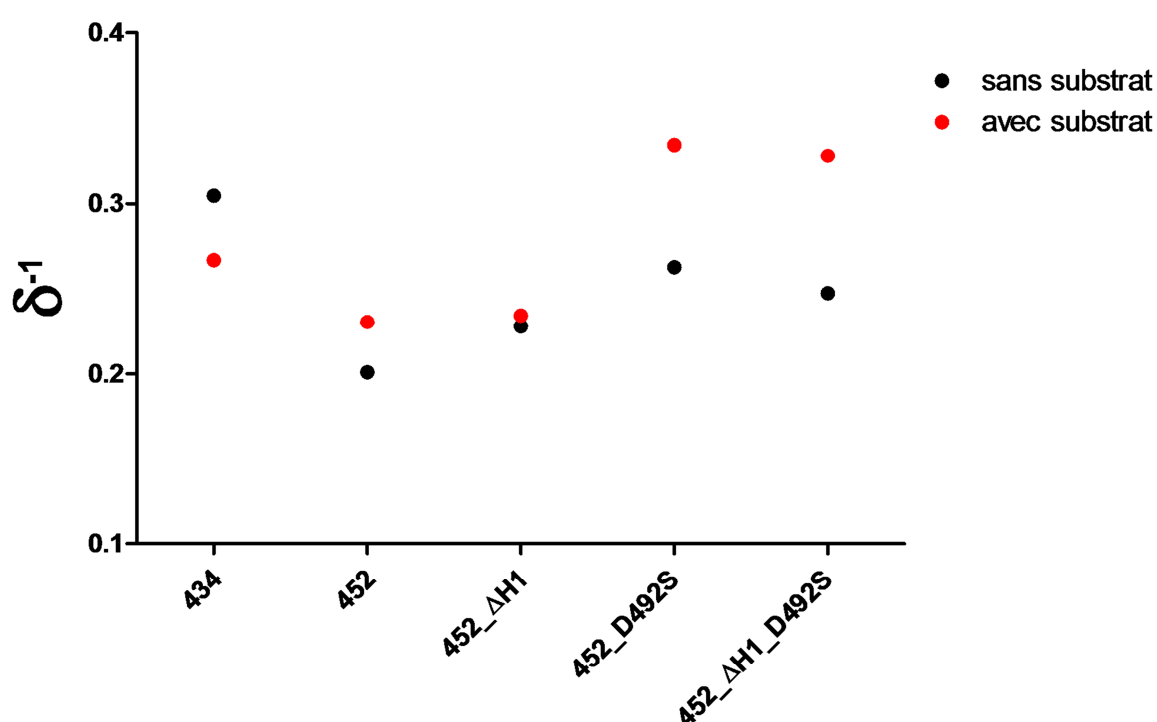


Figure 42 : Analyse de l'inverse de la largeur de raie centrale (δ^{-1}) des spectres RPE ci-dessus.

A la différence du linker (position 33), l'ajout du substrat ne modifie que très légèrement l'allure des spectres de FhaC_{434-R1} et FhaC_{452-R1}. Ceci suggère que la mobilité de L6 n'est pas grandement affectée par la présence du substrat. La première raie du spectre RPE en position 452 se creuse légèrement, ce qui laisse apparaître des pics de mobilités lente et rapide un peu mieux marqués. Ceci laisse supposer qu'en présence du substrat les conformations de L6 seraient un peu mieux définies. Afin de déterminer si la présence de H1 influence la mobilité de L6, nous avons regardé la mobilité de l'extrémité de cette boucle (position 452) dans le variant FhaC où il manque l'hélice H1 (Fig. 41C). Dans ce contexte, nous observons une diminution des composantes rapide et intermédiaire, associée à une composante lente plus représentée (Annexe 3). Ceci suggère qu'en l'absence de H1,

l'extrémité de la boucle est davantage stabilisée et que L6 adopterait moins de conformations différentes. Ainsi une partie des composantes observées précédemment (article ci-dessus) dans le spectre de la position 452 pourrait être associée à la présence de l'hélice H1 dans le tonneau β (Fig. 41BC). Comme observé précédemment, la présence du substrat a peu d'effet sur l'allure spectrale (Fig. 41C).

La mutation de l'acide aspartique en position 492 vers une sérine entraîne une modification de la mobilité en position 452. En rompant la liaison D₄₉₂-R₄₅₀ nous n'avons toutefois pas changé drastiquement la mobilité de L6, mais nous pouvons constater que certaines composantes de mobilité plus rapide sont plus représentées (Fig. 41 DE ; Fig. 42). De manière surprenante la présence du substrat a un effet beaucoup plus importante sur la mobilité en position 452 qui devient alors plus rapide (Fig. 41D ; Fig. 42). Ces mêmes observations ont été faites sur le variant FhaC ne possédant pas l'hélice H1, suggérant que ce n'est pas la sortie de l'hélice qui entraîne cette augmentation de rapidité (Fig. 41E; Fig. 42).

En conclusion, l'analyse de L6 par RPE nous révèle que la mobilité de sa chaîne polypeptidique ne correspond pas à la mobilité observée habituellement pour une structure de type boucle (Mchaourab et al., 1996). Sa localisation à l'intérieur du tonneau β entraîne une réduction importante de sa mobilité. Cette dernière se caractérise par une large gamme de mobilités, suggérant que L6 ne possède pas une conformation unique. Nos analyses précédentes ont révélé que dans une population de FhaC, l'hélice H1 adoptait plusieurs localisations (Guérin et al., 2014). Ainsi l'hétérogénéité de mobilité observée sur L6 pourrait être au moins en partie un reflet de cette variabilité. Puisque dans le mutant sans hélice H1, L6 semble davantage stabilisée, nous pouvons supposer que certains régimes de mobilité rapide et intermédiaire de la position 452 sont liés à la présence de H1 dans le canal, et donc les régimes plus lents représenteraient une proportion de FhaC avec l'hélice sortie du pore. Par ailleurs, nous avons pu observer que l'interaction avec le motif GxDxG du brin β_{13} rigidifiait en partie la chaîne polypeptidique de L6. Mais l'existence d'autres régimes de mobilité lente malgré la rupture de cette interaction, nous laisse supposer que L6 doit être stabilisée par d'autres interactions tertiaires (par exemple avec T469). Ainsi cette multitude de mobilités observées sur les spectres RPE de L6 pourraient s'expliquer par différentes interactions possibles entre l'intérieur du canal et L6 qui peuvent exister au sein de la population de FhaC.

De manière générale, la présence du substrat entraîne de légères variations de mobilité de L6, pouvant refléter des changements discrets de conformation. Nous ne savons toujours pas si L6 est capable de sortir du canal lors d'un cycle de sécrétion, mais l'ensemble des résultats obtenus par RPE en présence du substrat, montrent que L6 reste encore fortement ralenti. Ainsi nous pouvons affirmer que la reconnaissance du substrat n'est pas couplée avec une sortie de L6 qui reste en contact avec l'intérieur du tonneau β . Par conséquent si la boucle L6 devait sortir du canal, ceci devrait se faire à une étape plus tardive de la sécrétion, par exemple lors de l'engagement de la FHA à l'intérieur du canal. Cet engagement pourrait par exemple, provoquer certains changements conformationnels de FhaC, et favoriser la rupture de certaines interactions tertiaires reliant L6 au tonneau β ,

ce qui aurait pour conséquence de rendre L6 plus mobile. Bien que ceci soit fort hypothétique, nous avons peut-être mimé cette situation, puisque la position 452 est devenue plus mobile en présence du substrat, lorsque nous avons supprimé la liaison avec l'acide aspartique 492. Ces résultats pourraient alors confirmer d'autres résultats obtenus lors d'une expérience d'accessibilité *in vivo* par le Peg-maléimide qui se fixe sur des cystéines exposées à la surface des bactéries exprimant FhaC et un substrat modèle bloqué dans le pore. Dans ces expériences, la position 452 ne deviendrait accessible depuis la surface qu'en présence de la FHA bloqué dans le pore mais pas lorsque FhaC est 'au repos'.

Malheureusement nos analyses par RPE ne nous permettent pas d'accéder à l'étape de la sécrétion (l'engagement du substrat dans le canal), qui suit l'étape de reconnaissance initiale. Jusqu'à présent nous n'avons pu analyser cette étape que dans des tests *in vivo* sur bactéries entières.

b) Test de sensibilité aux antibiotiques : R₄₅₀-D₄₉₂

A l'instar de l'hélice H1, nous essayons actuellement de comprendre le fonctionnement de L6 avec le tonneau β afin d'apporter un modèle pour les autres membres des TpsB, et de manière plus générale pour la superfamille Omp85. En plus des techniques RPE, nous avons initié un premier travail préalable pour caractériser la liaison entre les deux motifs conservés, VRGY et GxDxG. Pour cela nous avons utilisé une technique de sensibilité aux antibiotiques basée sur la perméabilité membranaire. De manière générale les antibiotiques peuvent traverser de manière passive la membrane externe par des protéines de type porines (Pagès, 2004). Mais lorsque l'on fait exprimer FhaC par *E. coli* certains de ces antibiotiques sont aussi capables de passer par le tonneau β de FhaC, qui serait plus large que le canal des porines, en tous cas dans certaines conformations de FhaC. Ainsi des mutations touchant la perméabilité du canal peuvent affecter la pénétration de ces antibiotiques (Clantin et al., 2007). Pour ces expériences, nous avons réalisé des inversions de charges et remplacé Arg₄₅₀ par Asp et Asp₄₉₂ par Arg.

A	(1) Bacitracine	(2) Erythromycine	(3) Acide Nadilixique	(4) Novobiocine	(5) Rifampicine	(6) Vancomycine
W.T	13	16	16	19,5	21	11
R450D	15	17,5	21,5	25	30	15
D492R	15	18	22,5	26,5	30	16,5
D492R + R450D	6 (diamètre du disque en mm)	13	12,5	7	11	8

B

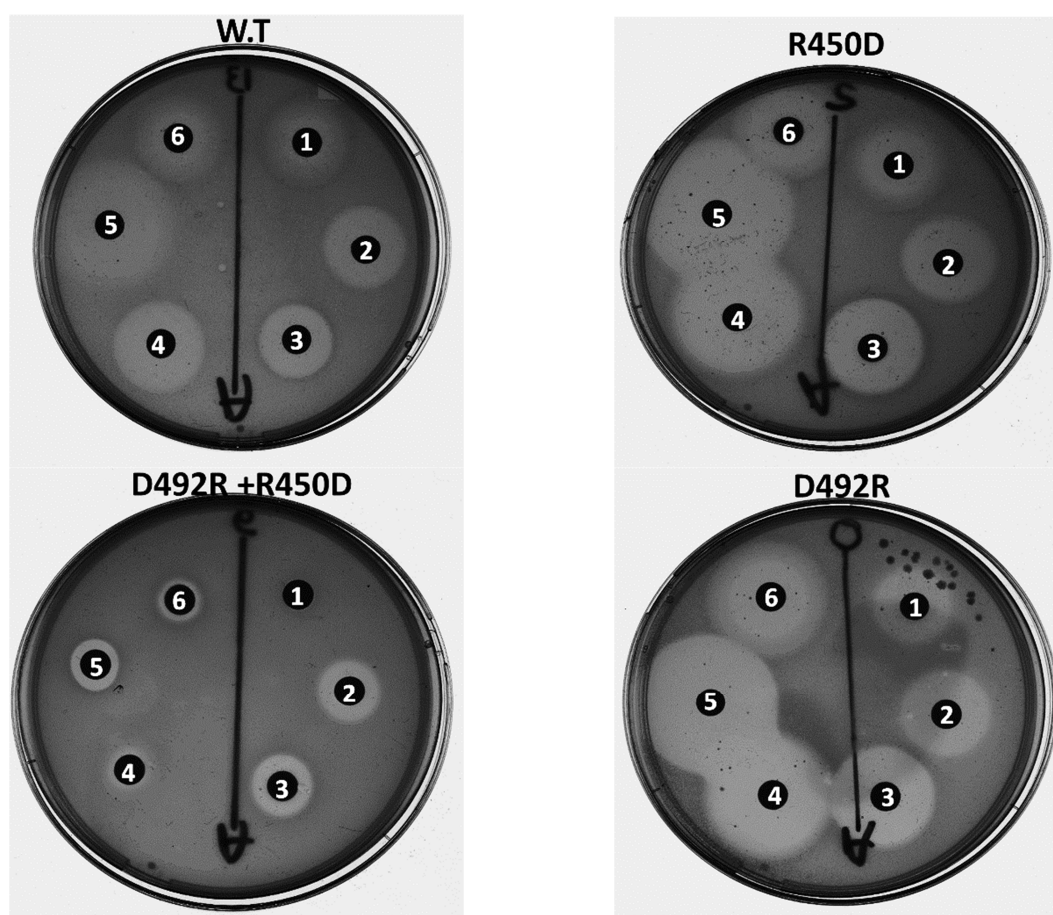


Figure 43: Test de sensibilité aux antibiotiques. A, Diamètres d'inhibition mesurés (en mm) de cultures sur boîte de E. coli produisant FhaC (sauvage, dénoté WT, ou variants) en présence d'un antibiotique (1 à 6). Les diamètres d'inhibition plus grands que le témoin sont représentés en rouge, et plus petits en bleu. B, Photos des boîtes de Petri. Les cultures forment un tapis bactérien sur la boîte sauf à proximité des disques de papier (ronds noirs) sur lesquels les antibiotiques sont déposés (1 à 6) et à partir desquels ils diffusent dans la gélose.

Ce test préliminaire (que nous devons reproduire dès que possible) est très encourageant. Il nous montre l'importance de l'interaction électrostatique entre l'acide aspartique 492 et l'arginine 450 pour la perméabilité du pore. Ainsi avec les mutations R450D ou D492R nous provoquons une répulsion de charges, qui a pour conséquence d'augmenter le diamètre d'inhibition de croissance pour la plupart des antibiotiques, suggérant que l'intérieur du canal est affecté et sans doute plus ouvert (Fig. 43AB). Lorsque nous générons une complémentation de charge (R450D + D492R), les diamètres d'inhibition sont très faibles, et de manière surprenante encore plus petits que ceux avec FhaC sauvage (WT, c'est-à-dire D492-R450) (Fig. 43AB). Cela confirme d'une part que ces 2 résidus interagissent ensemble grâce à leur charge. Mais d'autre part qu'il existe une asymétrie dans cette interaction, puisque la complémentation ne donne pas le même résultat que le W.T, et dans ce cas le canal semble davantage fermé. D'autres analyses de cette interaction devront bien entendu être réalisées par électrophysiologie et RPE. Mais ce résultat laisse supposer que la complémentation engendre une conductance plus faible du canal avec une boucle L6 plus fortement stabilisée que dans la conformation au repos, et sans doute dans une seule conformation. Ceci suggère aussi l'existence d'autre(s) conformation(s) de FhaC, dans lesquelles(s) l'arginine du motif VRGY pourrait être en interaction électrostatique avec d'autre(s) résidu(s) permettant alors au canal d'être plus ouvert pour faciliter le passage de la FHA par exemple. Ainsi dans FhaC sauvage, on pourrait supposer que L6 change de conformation de manière naturelle, mais que dans le mutant complémenté L6 serait incapable de le faire puisqu'il ne serait alors stabilisé que dans une conformation par l'interaction d'Arg450 avec Asp492.

6. Autres changements conformationnels possibles ?

Toute thèse s'accompagne aussi d'un ensemble de résultats qui demandent encore à être expliqués. Je vous présenterai dans cette dernière partie, certains de ces résultats que nous avons obtenus et qui pourraient indiquer d'autres changements de conformation de FhaC dans un environnement membranaire.

La position 195 est située sur une boucle reliant le brin $\beta 5$ au brin $\beta 6$ du domaine Potra2 (Fig. 44A). Ce brin $\beta 6$ est le dernier du domaine Potra2 qui est ensuite rattaché au tonneau β . Selon la structure de la protéine, cette boucle serait donc située dans le périplasme sans établir de contact direct avec le reste de la protéine. La structure cristallographique étant réalisée avec FhaC en micelle de détergent, l'analyse de la mobilité de cette position dans ce même contexte nous révèle un spectre RPE simple possédant un régime de mobilité assez rapide, autrement dit ce que l'on peut attendre pour une telle structure (Fig. 44B) (Mchaourab et al., 1996). Mais quand FhaC est réincorporée en protéoliposomes, l'allure du spectre change drastiquement. Nous détectons 2 types de composantes, de mobilités rapide et lente (Fig. 44B). L'ajout du substrat révèle un changement de conformation, durant lequel la composante lente diminue fortement et l'allure du spectre ressemble davantage à celui de FhaC en détergent (Fig. 44B).

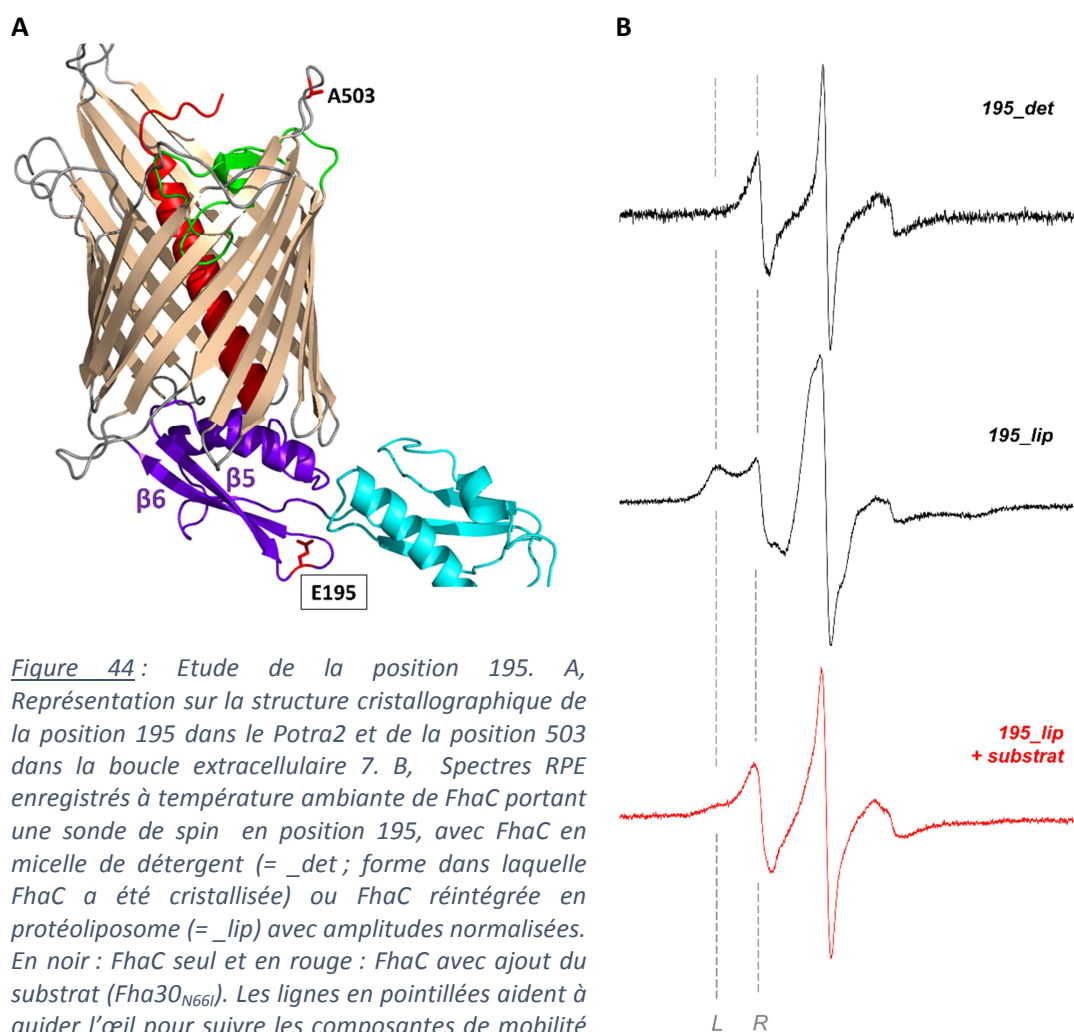


Figure 44: Etude de la position 195. A, Représentation sur la structure cristallographique de la position 195 dans le Potra2 et de la position 503 dans la boucle extracellulaire 7. B, Spectres RPE enregistrés à température ambiante de FhaC portant une sonde de spin en position 195, avec FhaC en micelle de détergent (= _det; forme dans laquelle FhaC a été cristallisée) ou FhaC réintégrée en protéoliposome (= _lip) avec amplitudes normalisées. En noir : FhaC seul et en rouge : FhaC avec ajout du substrat (Fha30_{N66I}). Les lignes en pointillées aident à guider l'œil pour suivre les composantes de mobilité lente (L) et rapide (R).

Ces résultats pourraient ainsi suggérer que le détergent ne solubilise qu'une certaine conformation de FhaC dans laquelle la position 195 possède une seule mobilité. Cette conformation serait donc celle qui a été cristallisée. Cependant dans une bicouche lipidique, cette région de FhaC pourrait adopter au minimum 2 conformations, l'une correspondant à la forme cristallographique et l'autre restant à déterminer. Le changement conformationnel observé lors de l'ajout du substrat laisse supposer que l'interaction avec la FHA stabilise la conformation qui correspond à la forme cristallographique et donc que cette conformation servirait principalement à la reconnaissance du partenaire. Nous avons donc essayé de caractériser cette deuxième conformation par RPE impulsionnelle. De manière très surprenante, quand la position 195 a été couplée avec une cystéine présente dans une boucle extracellulaire (position 503) (Fig. 44A), nous avons pu mesurer des distances, alors que la structure aux rayons X montre que ces deux positions sont trop espacées pour une mesure de distance par RPE impulsionnelle dans nos conditions.

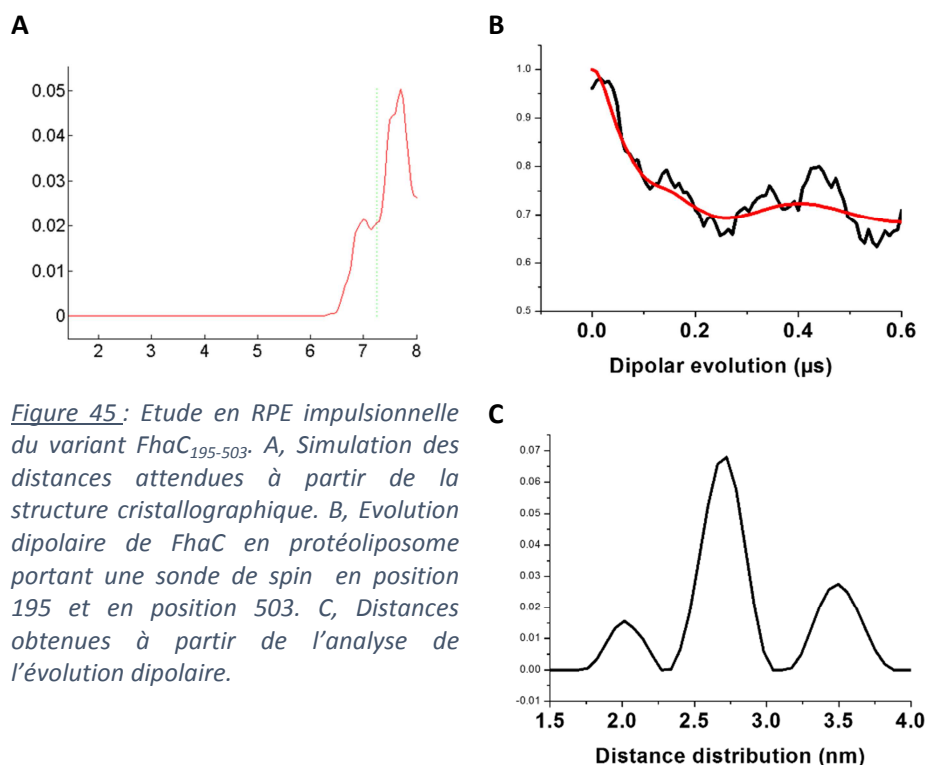


Figure 45: Etude en RPE impulsionnelle du variant FhaC₁₉₅₋₅₀₃. A, Simulation des distances attendues à partir de la structure cristallographique. B, Evolution dipolaire de FhaC en protéoliposome portant une sonde de spin en position 195 et en position 503. C, Distances obtenues à partir de l'analyse de l'évolution dipolaire.

En effet, si nous utilisons un programme permettant de prédire les distances que nous devrions obtenir selon les rotamères du MTSL en fonction de la structure cristallographique, nous nous apercevons que les distances attendues sont autour de 7 nm (Fig. 45A). Comme vu dans l'introduction et dans le papier, ces distances sont trop longues pour être mesurées dans nos expériences de RPE impulsionnelle du fait d'un temps de relaxation transverse trop court (1 μ s). Toutefois des distances vraiment courtes ont été mesurées (entre 2 et 4 nanomètres) (Fig. 45BC), suggérant que nous avons peut-être observé une conformation de FhaC dans laquelle le Potra2, ou du moins la boucle présente entre le β 5 et β 6, serait proche de la région extracellulaire. Par ailleurs, lors de l'ajout du substrat, nous avons obtenu une décroissance de l'évolution dipolaire homogène, suggérant que ces distances courtes ne sont plus présentes. Toutefois ce résultat doit encore être confirmé en reproduisant l'expérience de RPE impulsionnelle, car lors de l'ajout du substrat notre rapport signal/bruit est devenu étrangement très mauvais, rendant l'analyse difficile. Par ailleurs, nous avons contrôlé que ces distances mesurées ne correspondaient pas à des distances intermoléculaires. Les expériences de RPE impulsionnelle réalisées sur des variant de FhaC portant une seule sonde de spin, en position 195 ou 503, n'ont donné aucune distance mesurable. L'évolution dipolaire ne montrait pas d'oscillations périodiques, indiquant que les distances mesurées avec la protéine doublement marquée ne provenaient pas d'interactions intermoléculaires.

➤ *Conclusion sur la position 195 :*

La composante lente observée sur le spectre RPE en onde continue de la position 195 pourrait être liée à cette conformation dans laquelle la position 195 serait rapprochée de la position 503 (Fig. 44B, Fig. 45C). Une telle distance n'est envisageable qu'avec un rapprochement du domaine Potra2 (ou au moins de cette partie du domaine Potra2) de la membrane. S'il y avait un tel rapprochement, la position 195 pourrait alors se trouver proche des têtes polaires des lipides, ce qui aurait pour conséquence de ralentir le MTSL (Rice et al., 2014). A l'instar de l'hélice H1, nos données suggéreraient donc que plusieurs conformations existent en même temps dans la population de FhaC. Lors de la reconnaissance initiale entre les deux partenaires, le substrat ne pourrait interagir qu'avec la conformation correspondant à la forme cristallographique et la stabiliser. On peut émettre l'hypothèse que suite à la reconnaissance du substrat un tel changement de conformation du domaine Potra2 pourrait permettre d'initier la sécrétion à travers le pore en entraînant le domaine TPS vers le pore, puis en le relâchant. Bien évidemment ces spéculations devront être supportées par d'autres techniques et expériences.

Discussion et Perspectives

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis de progresser dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la sécrétion de la FHA. Nous avons ainsi initié un travail permettant d'une part de caractériser la mobilité des différents éléments structuraux de FhaC, et d'autre part d'en détecter les changements conformationnels lors de la reconnaissance de la FHA.

FhaC, une protéine membranaire...

L'étude de la dynamique d'une protéine en lien avec sa fonction n'est pas simple, mais en particulier, l'étude des protéines membranaires relève souvent du défi. Elles sont en général difficiles à surproduire et à purifier en grande quantité. Leur grande taille est parfois limitante pour les études dynamiques *in vitro* par des techniques comme la RMN et leur structure aux rayons X peut être difficile à obtenir. Dans la littérature, les études structure/fonction sur ce type de protéine ne sont pas encore très nombreuses.

Notre étude réalisée sur FhaC permet ainsi d'apporter un jeu de données supplémentaires touchant la dynamique conformationnelle d'une protéine membranaire. Dans le futur ceci pourrait permettre une meilleure compréhension de certaines fonctions de ces protéines qui sont dans un environnement membranaire non-énergisé, c'est-à-dire sans apport d'ATP et sans gradient électrochimique utilisable.

L'étude comparative de la mobilité de FhaC en détergent et en protéoliposomes prouve que certaines conformations et changements conformationnels ne sont détectables que dans cet environnement membranaire. Ce dernier est donc indispensable pour étudier le mécanisme de fonctionnement de FhaC. Associée à l'analyse de la structure cristallographique, notre étude permet ainsi de donner un regard nouveau, plus dynamique et plus réaliste en rendant compte de la diversité de conformations possibles au sein d'une population d'une protéine membranaire telle que FhaC.

FhaC, modèle de transporteur TpsB...

L'hélice α N-terminale et le linker sont communs et uniquement retrouvés parmi les transporteurs de type TpsB et ne sont donc pas présents chez les transporteurs Omp85. Ces deux éléments structuraux représentent donc une caractéristique évolutive spécifique à la voie de sécrétion à 2 partenaires. Au cours de notre étude réalisée sur FhaC, nous avons découvert que ces deux éléments structuraux subissent des changements de conformation permettant l'ouverture du canal de FhaC. Ainsi dans la condition au repos de la protéine, l'hélice α se localise principalement à l'intérieur du tonneau β qui est lui-même intégré dans la membrane. Cette conformation contraint alors le linker à proximité des domaines Potra, et il est fortement immobilisé par des interactions tertiaires avec ces derniers (Fig. 46). Nos

expériences suggèrent aussi que dans une plus faible proportion de la population, cette hélice α pouvait aussi se localiser en dehors du canal et que la présence de la FHA permettait d'augmenter fortement cette proportion. De plus, l'utilisation de la RPE impulsienne nous a permis de mesurer ce déplacement conformationnel en confirmant que l'hélice α N-terminale était en dehors du pore lorsque Fha30 était en contact avec les domaines POTRA (Fig. 46).

Ainsi nos différents résultats *in vivo* et *in vitro* suggèrent qu'il existe un équilibre conformationnel dynamique entre l'état fermé et l'état ouvert du canal. Lors de l'étape de reconnaissance de la FHA, le domaine TPS prendrait alors la place du linker le long des domaines POTRA, ce qui empêcherait au linker et à l'hélice α de reprendre leur place avec comme conséquence de déplacer cet équilibre vers l'état ouvert de FhaC. Ceci permet ensuite à la FHA de transiter à travers à l'intérieur du tonneau β .

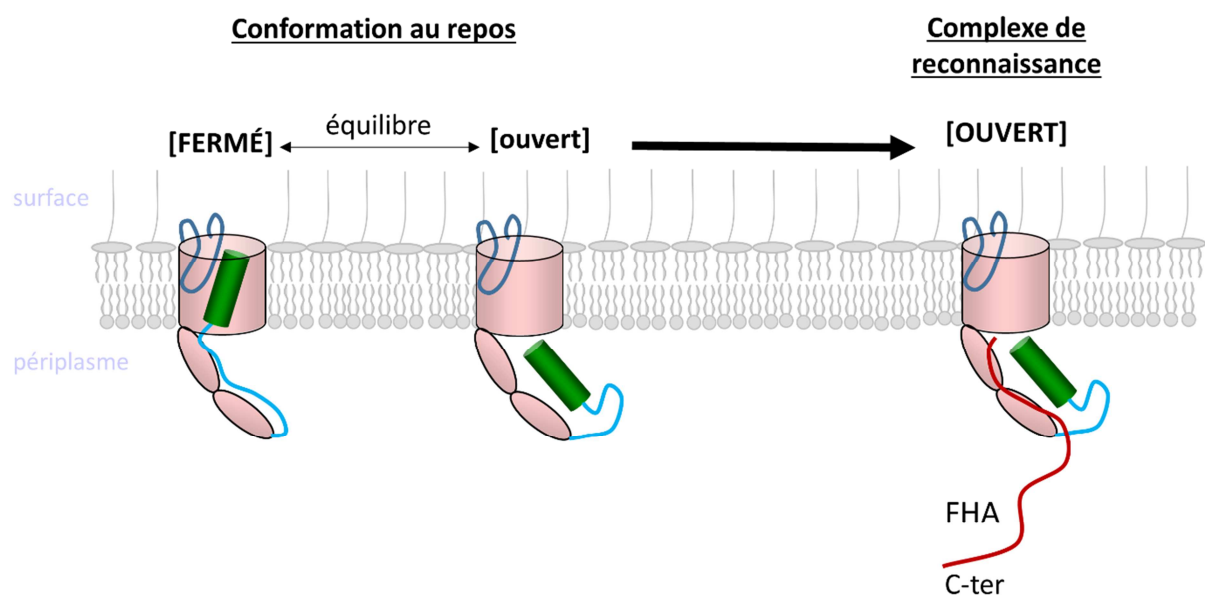


Figure 46 : Représentation des différentes conformations de FhaC dans la membrane externe asymétrique. Au repos, il existe un équilibre conformationnel dans lequel l'état fermé est majoritaire. La présence de la FHA le long des domaines POTRA déplace cet équilibre, l'état ouvert devient alors majoritaire. Nos résultats indiquent que la boucle L6 ne subit pas de changement conformationnel lors de ces étapes de la sécrétion.

Au cours de cette thèse, nous avons caractérisé la fonction de cette hélice α . En utilisant un variant de FhaC dans lequel cette hélice est bloquée à l'intérieur du pore, nous avons montré par électrophysiologie que dans cette conformation le canal possédait une très faible conductance. Ce qui suggère que l'hélice α N-terminale servirait de « bouchon » en diminuant la diffusion non spécifique de solutés à travers le pore.

De manière plus générale, tous les TpsB partagent une organisation structurale identique, avec la présence de motifs conservés au cours de l'évolution, et toutes nos expériences en présence du substrat ont été réalisées avec le domaine TPS qui est partagé parmi tous les TpsA. Nous pouvons ainsi supposer que tous ces résultats obtenus sur la dynamique conformationnelle de FhaC sont transposables à tous les autres systèmes TpsA/TpsB.

FhaC, prototype d'une sous-famille de transporteurs Omp85

Les TpsB (et donc FhaC) appartiennent à la même superfamille que les transporteurs BamA qu'on trouve également dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Omp85 est l'ancienne dénomination des protéines BamA, et ce terme désigne aujourd'hui la superfamille dans son ensemble. Ces transporteurs BamA sont essentiels, bien plus ubiquitaires que les TpsB, puisqu'on les trouve dans toutes les bactéries didermes, permettent l'intégration de protéines dans la membrane externe. En plus de ces transporteurs bactériens, des homologues présents dans les chloroplaste, les mitochondries et dans certaines membranes d'organismes unicellulaires résultant de symbioses successives partagent une architecture commune, avec un tonneau β formé de 16 brins β , une région N-terminale extra-membranaire structurée en domaine(s) POTRA, et une boucle L6 localisée à mi-hauteur du tonneau β portant une tétrade VRGY/F très conservée et qui est spatialement proche d'un deuxième motif F/GxDxG présent sur le brin β 13. La conservation évolutive de toutes ces structures nous pousse à nous interroger sur leur rôle précis dans la fonction de ces protéines. Donc bien que les fonctions de ces différents transporteurs soient différentes (intégration versus translocation) ces protéines doivent partager des mécanismes fondamentaux.

Nous nous sommes ainsi intéressés à la boucle L6. Nous avons montré que cette dernière avait une mobilité très contrainte dans le canal et qu'à la différence de H1, elle ne subissait pas de changement de conformation drastique lors de la reconnaissance avec le substrat (Fig. 46). Nous savons qu'elle est essentielle pour la fonction. Elle doit donc jouer son rôle à une étape de la sécrétion après la reconnaissance du substrat, et vraisemblablement dans le mécanisme de translocation lui-même. Son rôle précis pendant la sécrétion nous reste toutefois inconnu, même si certains résultats obtenus *in vivo* par Catherine Baud au laboratoire indiquent que cette boucle pourrait sortir du canal au moins partiellement, possiblement pour ménager une plus grande ouverture pour le passage du substrat.

Les structures cristallographiques récentes de BamA ont suggéré une interaction entre les 2 motifs (VRGY/F et F/GxDxG) conservés dans la superfamille. Cette interaction semble conservée au cours de l'évolution, puisque nous avons pu l'observer et l'analyser sur FhaC durant cette thèse. Ainsi la rupture de cette liaison déconstruit L6 en rendant cette boucle plus mobile, principalement en présence du substrat, et augmente la perméabilité du pore, ce qui indique que L6 peut sortir du pore ou se positionner de façon différente dans le pore. Ceci laisse supposer que cette liaison pourrait se rompre de manière naturelle dans la conformation active, c'est-à-dire durant un cycle de sécrétion ou d'insertion de protéine dans la membrane externe, facilitant ainsi les changements de conformation de L6. Une rupture de cette liaison entre VRGY et FGxDxG à l'intérieur du pore au cours du cycle de sécrétion pourrait aussi permettre à L6 qui est stratégiquement placée, de stabiliser d'autres conformations transitoires (putatives) du tonneau β , comme par exemple une conformation résultant de l'ouverture latérale supposée des Omp85.

Puisque les tonneaux β de BamA et TamA et des TpsB sont très similaires, au cours de notre travail, nous nous sommes interrogés si cette ouverture latérale du tonneau β avait pu être aussi conservée et partagée dans la superfamille. En dehors de simulations en dynamique

moléculaire, ceci n'a pu être démontré pour aucun membre de la famille. Cependant si cet élargissement fait partie du mécanisme pour les transporteurs qui insèrent leur substrat dans la membrane, on peut imaginer qu'il existe aussi pour ceux qui transportent leur substrat à travers la membrane.

Une telle ouverture dans le processus de sécrétion par les transporteurs TpsB pourrait permettre un élargissement du tonneau β , facilitant ainsi le transport du substrat et/ou la sortie de l'hélice H1 par exemple. Malheureusement nous n'avons pu obtenir jusqu'ici aucune preuve expérimentale directe d'un tel élargissement qui doit correspondre, s'il existe, à un changement de conformation transitoire.

Cependant, un de nos résultats obtenus lors de l'étude de la dynamique de FhaC, montre un changement de conformation possible du Potra2. Ce dernier se rapprocherait du tonneau β de la protéine. Nous n'avons pas encore assez de données pour expliquer ce changement de conformation, et pouvoir définir s'il s'agit d'une caractéristique fonctionnelle unique aux TpsB ou partagée dans la superfamille. Toutefois, il est intéressant de noter que lors de la résolution de la structure de BamA, les auteurs ont pu cristalliser 2 localisations différentes du domaine Potra5, qui est le dernier avant le tonneau β . L'une correspond à ce domaine Potra très proche et en interaction tertiaire avec le tonneau, l'autre étant plus distale et sans interaction. Les auteurs ont ainsi proposé que le déplacement du Potra5 puisse être couplé avec le processus d'ouverture latérale du tonneau. Enfin, ces différentes données sur BamA et sur FhaC, suggèrent que le dernier domaine Potra ne serait pas fixe dans le périplasma mais subirait un déplacement couplé avec un changement de conformation. Ces résultats préliminaires pourraient refléter un mécanisme qu'utilisent ces transporteurs pour conduire leur substrat du dernier Potra vers le tonneau β .

FhaC, une histoire à suivre... (Perspectives)

Les résultats de cette thèse ont permis de caractériser la dynamique conformationnelle de FhaC seul et lors de sa reconnaissance avec le domaine TPS de son partenaire. L'étape suivante serait donc de pouvoir déterminer la conformation en action de FhaC, c'est-à-dire lorsque la FHA transite dans le pore. Pour cela un travail *in vivo* a été initié en caractérisant l'accessibilité de certaines cystéines au Peg-maléimide, un réactif de 5 kDa vraisemblablement trop gros pour traverser la membrane par le pore de FhaC, en absence ou en présence du complexe bloqué (FhaC + Fha30_BugE). Pour déterminer de manière plus précise sa conformation (cristallographie, RPE etc...), nous avons tenté de purifier ce complexe bloqué, cependant pour l'instant, sans succès puisque ce complexe se dissocie au cours des étapes d'extraction au détergent. Il serait donc nécessaire de re-stabiliser ce complexe et/ou de réadapter nos méthodes de purification. Cette dissociation est intrigante, puisque Fha30 et BugE seraient tous les deux repliés de part et d'autre de la membrane externe et seraient reliés par un segment peptidique vraisemblablement étendu à travers le pore de FhaC.

Bien que nous ayons caractérisé la sortie de l'hélice H1 en dehors du pore et le chemin qu'emprunte la FHA à l'intérieur de ce dernier (article soumis par Catherine Baud, dont je

suis co-auteur, présenté en annexe 2), nous ne savons toujours pas par quel mécanisme le substrat passe d'une interaction avec le Potra2 à l'entrée du canal. Nous avons suggéré que le Potra2 pouvait être acteur de ce mécanisme lors d'un déplacement couplé à un changement de conformation observable dans un environnement membranaire. Pour confirmer notre théorie, nous pouvons utiliser des cystéines placées à différentes positions sur le Potra2 et sur le reste de la protéine afin de trianguler sa position en RPE impulsienne. Couplée avec l'analyse de la mobilité du Potra2, nous pourrions ainsi caractériser ce changement conformationnel, pour autant qu'il produise avant l'engagement du substrat dans le canal, puisque nous n'avons pas accès à cette étape *in vitro*. Puisque nos premiers résultats de RPE suggèrent qu'au moins une partie du Potra2 peut se rapprocher du reste de la protéine de façon spontanée (sans substrat), nous pourrions confirmer ces données par une seconde technique de résonance, plus couramment utilisée en biologie, basée sur le transfert d'énergie entre 2 fluorochromes physiquement proches (de type FRET, voire smFRET). Ce travail montrerait alors qu'en plus de la reconnaissance, ce domaine Potra a un rôle fonctionnel lors de la sécrétion. Cette analyse pourrait ainsi fournir de nouvelles pistes mécanistiques sur la fonction de ces domaines dans les transporteurs de type Omp85 et dans la sécrétion de type 5d.

L'un des enjeux principaux qui reste encore à résoudre est le mécanisme de fonctionnement qui implique le tonneau, la boucle L6 et possiblement le dernier Potra. Puisque tous ces éléments sont indispensables pour la translocation mais aussi pour l'insertion, nous pensons que le mécanisme d'action a été conservé au cours de l'évolution. Par ses interactions avec l'intérieur du tonneau β la boucle L6 serait un élément actif du fonctionnement du tonneau β . Plusieurs modèles de fonctionnement sont envisageables :

- Dans le cas de translocation à travers le pore (TpsB, et peut-être BamA dans le cas de la sécrétion du domaine passager des autotransporteurs), la boucle L6 pourrait interagir avec le substrat présent dans le canal. Il y aurait alors rupture des interactions tertiaires entre l'intérieur du canal et L6, puis cette boucle devenue plus mobile pourrait alors emmener le substrat en-dehors du pore et peut-être même aider au repliement initial du substrat. La boucle L6 se retrouverait donc à l'extérieur du canal jusqu'à la fin de la sécrétion, laissant ainsi au substrat plus de place dans le tonneau β .

- Dans le cas de l'insertion du substrat dans la membrane externe (BamA), la boucle L6 pourrait stabiliser le tonneau β dans une conformation alternative depuis l'intérieur et favoriser ainsi une ouverture latérale entre les brins $\beta 1$ et $\beta 16$. Cette conformation stabilisée par L6, faciliterait la formation d'un canal mixte transitoire entre BamA et la protéine substrat. Il n'est pas non plus exclu que durant ce processus le tonneau β soit stabilisé aussi par des interactions avec le domaine Potra. Les TpsB ne font pas d'insertion latérale de leurs substrats, mais on ne peut pas pour autant écarter l'hypothèse d'une ouverture latérale du tonneau pour générer une conformation ouverte (tonneau élargi).

Ces différentes hypothèses reposent ainsi sur plusieurs mécanismes faisant intervenir la boucle L6, le tonneau β et vraisemblablement aussi les domaines POTRA, au moins le dernier. On pourrait caractériser les conformations que cette boucle L6 contribue à stabiliser dans des expériences d'électrophysiologie avec des mutants. Au cours de ces expériences,

avec la protéine sauvage, nous avons remarqué qu'il existait une forme minoritaire de FhaC avec une plus forte conductance qui suggèrerait un canal élargi. L'utilisation d'un variant de FhaC dans lequel nous avons supprimé ou modifié génétiquement la boucle L6 pourrait ainsi nous donner une information sur l'importance de cette boucle pour les propriétés de canal, mesurées par la conductance, de FhaC. Nous avons déjà obtenu certains variants de FhaC mutés dans cette boucle L6 et/ou affectés dans son interaction avec l'intérieur du tonneau β dans une forme 'ouverte' putative. Ces variants et d'autres mutants supplémentaires à créer pourraient être analysés tout d'abord pour leur sensibilité aux antibiotiques qui permet de discriminer rapidement des mutants affectés dans la perméabilité, puis par électrophysiologie, RPE en onde continue et RPE pulsée.

Ces conformations transitoires peuvent correspondre à des étapes discrètes mais essentielles au processus de translocation à travers la membrane externe. Nos résultats sur FhaC indiquent que ces dynamiques de conformation sont intrinsèques au fonctionnement de la protéine. Mais la détection directe de ces formes transitoires représente un vrai challenge, indispensable pour la compréhension du mécanisme de sécrétion à 2 partenaires (TPS), et de manière plus générale du fonctionnement des membres de la superfamille Omp85.

Bibliographie

Aoki, S.K., Diner, E.J., de Roodenbeke, C. t'Kint, Burgess, B.R., Poole, S.J., Braaten, B.A., Jones, A.M., Webb, J.S., Hayes, C.S., Cotter, P.A., et al. (2010). A widespread family of polymorphic contact-dependent toxin delivery systems in bacteria. *Nature* 468, 439–442.

Arnold, T., Zeth, K., and Linke, D. (2010). Omp85 from the Thermophilic Cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* Differs from Proteobacterial Omp85 in Structure and Domain Composition. *J. Biol. Chem.* 285, 18003–18015.

Azarkh, M., Singh, V., Okle, O., Seemann, I.T., Dietrich, D.R., Hartig, J.S., and Drescher, M. (2012). Site-directed spin-labeling of nucleotides and the use of in-cell EPR to determine long-range distances in a biologically relevant environment. *Nat. Protoc.* 8, 131–147.

Barnard, T.J., Dautin, N., Lukacik, P., Bernstein, H.D., and Buchanan, S.K. (2007). Autotransporter structure reveals intra-barrel cleavage followed by conformational changes. *Nat. Struct. 38 Mol. Biol.* 14, 1214–1220.

Van den Berg, B., Clemons, W., Collinson, I., Harrison, S., and Rapoport, T.A. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427.

Bordignon, E. (2012). Site-Directed Spin Labeling of Membrane Proteins. 321.

Buscher, A.Z., Grass, S., Heuser, J., Roth, R., and St. Geme, J.W. (2006). Surface anchoring of a bacterial adhesin secreted by the two-partner secretion pathway. *Mol. Microbiol.* 61, 470–483.

Chevalier, N., Moser, M., Koch, H.-G., Schimz, K.-L., Willery, E., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., and Müller, M. (2004). Membrane Targeting of a Bacterial Virulence Factor Harboring an Extended Signal Peptide. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 8, 7–18.

Clantin, B., Hodak, H., Willery, E., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., and Villeret, V. (2004). The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6194–6199.

Clantin, B., Delattre, A.-S., Rucktooa, P., Saint, N., Meli, A.C., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., and Villeret, V. (2007). Structure of the Membrane Protein FhaC: A Member of the Omp85-TpsB Transporter Superfamily. *Science* 317, 957–961.

Coutte, L., Antoine, R., Drobecq, H., Locht, C., and Jacob-Dubuisson, F. (2001). Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *EMBO J* 20, 5040–5048.

Coutte, L., Alonso, S., Reveneau, N., Willery, E., Quatannens, B., Locht, C., and Jacob-Dubuisson, F. (2003). Role of Adhesin Release for Mucosal Colonization by a Bacterial Pathogen. *J. Exp. Med.* 197, 735–742.

- Crane, J.M., Mao, C., Lilly, A.A., Smith, V.F., Suo, Y., Hubbell, W.L., and Randall, L.L. (2005). Mapping of the Docking of SecA onto the Chaperone SecB by Site-directed Spin Labeling: Insight into the Mechanism of Ligand Transfer During Protein Export. *J. Mol. Biol.* 353, 295–307.
- Crane, J.M., Suo, Y., Lilly, A.A., Mao, C., Hubbell, W.L., and Randall, L.L. (2006). Sites of Interaction of a Precursor Polypeptide on the Export Chaperone SecB Mapped by Site-directed Spin Labeling. *J. Mol. Biol.* 363, 63–74.
- Delattre, A.-S., Clantin, B., Saint, N., Locht, C., Villeret, V., and Jacob-Dubuisson, F. (2010). Functional importance of a conserved sequence motif in FhaC, a prototypic member of the TpsB/Omp85 superfamily: Importance of conserved motif in transporter FhaC. *FEBS J.* 277, 4755–4765.
- Delattre, A.-S., Saint, N., Clantin, B., Willery, E., Lippens, G., Locht, C., Villeret, V., and Jacob-Dubuisson, F. (2011). Substrate recognition by the POTRA domains of TpsB transporter FhaC: Substrate recognition by POTRA domains of FhaC. *Mol. Microbiol.* 81, 99–112.
- Driessen, A.J.M., and Nouwen, N. (2008). Protein Translocation Across the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 643–667.
- Emsley, P., Ian, C., Fairweather, N., and Neil, W.I. (1996). Structure of Bordetella pertussis virulence factor P.69 pertactin. *Nature* 381, 90–92.
- Fairman, J.W., Dautin, N., Wojtowicz, D., Liu, W., Noinaj, N., Barnard, T.J., Udho, E., Przytycka, T.M., Cherezov, V., and Buchanan, S.K. (2012). Crystal Structures of the Outer Membrane Domain of Intimin and Invasin from Enterohemorrhagic E. coli and Enteropathogenic Y. pseudotuberculosis. *Structure* 20, 1233–1243.
- Fan, E., Fiedler, S., Jacob-Dubuisson, F., and Muller, M. (2012). Two-partner Secretion of Gram-negative Bacteria: A SINGLE -BARREL PROTEIN ENABLES TRANSPORT ACROSS THE OUTER MEMBRANE. *J. Biol. Chem.* 287, 2591–2599.
- Gabel, F., Lensink, M.F., Clantin, B., Jacob-Dubuisson, F., Villeret, V., and Ebel, C. (2014). Probing the Conformation of FhaC with Small-Angle Neutron Scattering and Molecular Modeling. *Biophys. J.* 107, 185–196.
- Grijpstra, J., Arenas, J., Rutten, L., and Tommassen, J. (2013). Autotransporter secretion: varying on a theme. *Res. Microbiol.* 164, 562–582.
- Grin, I., Hartmann, M.D., Sauer, G., Hernandez Alvarez, B., Schutz, M., Wagner, S., Madlung, J., Macek, B., Felipe-Lopez, A., Hensel, M., et al. (2014). A Trimeric Lipoprotein Assists in Trimeric Autotransporter Biogenesis in Enterobacteria. *J. Biol. Chem.* 289, 7388–7398.
- Gruss, F., Zähringer, F., Jakob, R.P., Burmann, B.M., Hiller, S., and Maier, T. (2013). The structural basis of autotransporter translocation by TamA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 1318–1320.

- Guedin, S. (2000). Novel Topological Features of FhaC, the Outer Membrane Transporter Involved in the Secretion of the *Bordetella pertussis* Filamentous Hemagglutinin. *J. Biol. Chem.* 275, 30202–30210.
- Guérin, J., Baud, C., Touati, N., Saint, N., Willery, E., Locht, C., Vezin, H., and Jacob-Dubuisson, F. (2014). Conformational dynamics of protein transporter FhaC: large-scale motions of plug helix: Conformational dynamics of FhaC. *Mol. Microbiol.* 92, 1164–1176.
- Hagan, C.L., Silhavy, T.J., and Kahne, D. (2011). β -Barrel Membrane Protein Assembly by the Bam Complex. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 189–210.
- Hamburger, Z.A. (1999). Crystal Structure of Invasin: A Bacterial Integrin-Binding Protein. *Science* 286, 291–295.
- Harris, C.R., and Silhavy, T.J. (1999). Mapping an interface of SecY (PrlA) and SecE (PrlG) by using synthetic phenotypes and in vivo cross-linking. *J. Bacteriol.* 181, 3438–3444.
- Hashemi Shabestari, M. (2013). Spin-label EPR on disordered and amyloid proteins (Leiden University).
- Henderson, I.R., Cappello, R., and Nataro, J.P. (2000). Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion. *Trends Microbiol.* 8, 529–532.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C., and Ala'Aldeen, D. (2004). Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 692–744.
- Hodak, H., Clantin, B., Willery, E., Villeret, V., Locht, C., and Jacob-Dubuisson, F. (2006). Secretion signal of the filamentous haemagglutinin, a model two-partner secretion substrate. *Mol. Microbiol.* 61, 368–382.
- Ieva, R., and Bernstein, H.D. (2009). Interaction of an autotransporter passenger domain with BamA during its translocation across the bacterial outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 19120–19125.
- Ieva, R., Tian, P., Peterson, J.H., and Bernstein, H.D. (2011). Sequential and spatially restricted interactions of assembly factors with an autotransporter domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, E383–E391.
- J.N.Junk, M. (2012). Assessing the Functional Structure of Molecular Transporters by EPR Spectroscopy (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).
- Jacob-Dubuisson, F., El-Hamel, C., Saint, N., Guédin, S., Willery, E., Molle, G., and Locht, C. (1999). Channel formation by FhaC, the outer membrane protein involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J. Biol. Chem.* 274, 37731–37735.
- Jacob-Dubuisson, F., Fernandez, R., and Coutte, L. (2004). Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 235–257.

- Jacob-Dubuisson, F., Villeret, V., Clantin, B., Delattre, A.-S., and Saint, N. (2009). First structural insights into the TpsB/Omp85 superfamily. *Biol. Chem.* 390.
- Jacob-Dubuisson, F., Guérin, J., Baelen, S., and Clantin, B. (2013). Two-partner secretion: as simple as it sounds? *Res. Microbiol.* 164, 583–595.
- Kajava, A.V., Cheng, N., Cleaver, R., Kessel, M., Simon, M.N., Willery, E., Jacob-Dubuisson, F., Loch, C., and Steven, A.C. (2001). Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins. *Mol. Microbiol.* 42, 279–292.
- Khan, S., Mian, H.S., Sandercock, L.E., Chirgadze, N.Y., and Pai, E.F. (2011). Crystal Structure of the Passenger Domain of the *Escherichia coli* Autotransporter EspP. *J. Mol. Biol.* 413, 985–1000.
- Kim, S., Malinverni, J.C., Sliz, P., Silhavy, T.J., Harrison, S.C., and Kahne, D. (2007). Structure and Function of an Essential Component of the Outer Membrane Protein Assembly Machine. *Science* 317, 961–964.
- Lambert-Buisine, C., Willery, E., Loch, C., and Jacob-Dubuisson, F. (1998). N-terminal characterization of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Mol. Microbiol.* 28, 1283–1293.
- Lehr, U., Schütz, M., Oberhettinger, P., Ruiz-Perez, F., Donald, J.W., Palmer, T., Linke, D., Henderson, I.R., and Autenrieth, I.B. (2010). C-terminal amino acid residues of the trimeric autotransporter adhesin YadA of *Yersinia enterocolitica* are decisive for its recognition and assembly by BamA: YadA is recognized and assembled by the BAM complex. *Mol. Microbiol.* 78, 932–946.
- Leininger, E., Roberts, M., Kenimer, J.G., Charles, I.G., Fairweather, N., Novotny, P., and Brennan, M.J. (1991). Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 345–349.
- Leonard-Rivera, M., and Misra, R. (2012). Conserved Residues of the Putative L6 Loop of *Escherichia coli* BamA Play a Critical Role in the Assembly of β -Barrel Outer Membrane Proteins, Including That of BamA Itself. *J. Bacteriol.* 194, 4662–4668.
- Lukasik, S., Ho, D., and Cafiso, D. (2007). Molecular Basis for Substrate-Dependent Transmembrane Signaling in an Outer-Membrane Transporter. *J. Mol. Biol.* 370, 807–811.
- Maillard, A.P., Lalani, S., Silva, F., Belin, D., and Duong, F. (2007). Deregulation of the SecYEG Translocation Channel upon Removal of the Plug Domain. *J. Biol. Chem.* 282, 1281–1287.
- Makhov, A., Steven, A., Hannah, J., and Simon, M. (1994). Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. A bacterial adhesin formed as a 50-nm monomeric rigid rod based on a 19-residue repeat motif rich in beta strands and turns. *J. Mol. Biol.* 241, 110–124.
- Mazar, J., and Cotter, P.A. (2006). Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Mol. Microbiol.* 62, 641–654.

- Mchaourab, H.S., Lietzow, M.A., Hideg, K., and Hubbell, W.L. (1996). Motion of spin-labeled side chains in T4 lysozyme. Correlation with protein structure and dynamics. *Biochemistry (Mosc.)* 35, 7692–7704.
- Meli, A.C., Hodak, H., Clantin, B., Locht, C., Molle, G., Jacob-Dubuisson, F., and Saint, N. (2006). Channel Properties of TpsB Transporter FhaC Point to Two Functional Domains with a C-terminal Protein-conducting Pore. *J. Biol. Chem.* 281, 158–166.
- Meng, G., Surana, N.K., St Geme, J.W., and Waksman, G. (2006). Structure of the outer membrane translocator domain of the *Haemophilus influenzae* Hia trimeric autotransporter. *EMBO J.* 25, 2297–2304.
- Meng, G., St. Geme, J.W., and Waksman, G. (2008). Repetitive Architecture of the *Haemophilus influenzae* Hia Trimeric Autotransporter. *J. Mol. Biol.* 384, 824–836.
- Mobberley-Schuman, P.S., and Weiss, A.A. (2005). Influence of CR3 (CD11b/CD18) Expression on Phagocytosis of *Bordetella pertussis* by Human Neutrophils. *Infect. Immun.* 73, 7317–7323.
- Noël, C.R., Mazar, J., Melvin, J.A., Sexton, J.A., and Cotter, P.A. (2012). The prodomain of the *Bordetella* two-partner secretion pathway protein FhaB remains intracellular yet affects the conformation of the mature C-terminal domain: Transmembrane intramolecular chaperone. *Mol. Microbiol.* 86, 988–1006.
- Noinaj, N., Kuszak, A.J., Gumbart, J.C., Lukacik, P., Chang, H., Easley, N.C., Lithgow, T., and Buchanan, S.K. (2013). Structural insight into the biogenesis of β -barrel membrane proteins. *Nature* 501, 385–390.
- Oberhettinger, P., Schütz, M., Leo, J.C., Heinz, N., Berger, J., Autenrieth, I.B., and Linke, D. (2012). Intimin and Invasin Export Their C-Terminus to the Bacterial Cell Surface Using an Inverse Mechanism Compared to Classical Autotransport. *PLoS ONE* 7, e47069.
- Oomen, C.J., van Ulsen, P., Van Gelder, P., Feijen, M., Tommassen, J., and Gros, P. (2004). Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *EMBO J.* 23, 1257–1266.
- Pagès, J.-M. (2004). Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques. *Med Sci Paris* 20, 346–351.
- Peterson, J.H., Tian, P., Ieva, R., Dautin, N., and Bernstein, H.D. (2010). Secretion of a bacterial virulence factor is driven by the folding of a C-terminal segment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 17739–17744.
- Plath, K., Mothes, W., Wilkinson, B.M., Stirling, C.J., and Rapoport, T.A. (1998). Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell* 94, 795–807.
- Du Plessis, D.J.F., Nouwen, N., and Driessen, A.J.M. (2011). The Sec translocase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1808, 851–865.

- Pohlner, J. (1987). Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* 325, 458–462.
- Ricci, D.P., and Silhavy, T.J. (2012). The Bam machine: a molecular cooper. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr.* 1818, 1067–1084.
- Rice, A.J., Alvarez, F.J., Davidson, A.L., and Pinkett, H.W. (2014). Effects of lipid environment on the conformational changes of an ABC importer. *Channels* 8.
- Robert, V., Volokhina, E., Senf, F., Bos, M., Van Gelder, P., and Tommassen, J. (2006). Assembly Factor Omp85 Recognizes Its Outer Membrane Protein Substrates by a Species-Specific C-Terminal Motif. *PLOS Biol.* 4.
- Salacha, R., Kovačić, F., Brochier-Armanet, C., Wilhelm, S., Tommassen, J., Filloux, A., Voulhoux, R., and Bleves, S. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* patatin-like protein PlpD is the archetype of a novel Type V secretion system. *Environ. Microbiol.*
- Saparov, S.M., Erlandson, K., Cannon, K., Schaletzky, J., Schulman, S., Rapoport, T.A., and Pohl, P. (2007). Determining the Conductance of the SecY Protein Translocation Channel for Small Molecules. *Mol. Cell* 26, 501–509.
- Silhavy, T.J., Ruiz, N., and Kahne, D. (2006). Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 57–66.
- Soprova, Z., Sauri, A., van Ulsen, P., Tame, J.R.H., den Blaauwen, T., Jong, W.S.P., and Luirink, J. (2010). A Conserved Aromatic Residue in the Autochaperone Domain of the Autotransporter Hbp Is Critical for Initiation of Outer Membrane Translocation. *J. Biol. Chem.* 285, 38224–38233.
- Stoll, S., and Schweiger, A. (2006). EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J. Magn. Reson.* 178, 42–55.
- Szabady, R.L., Peterson, J.H., Skillman, K.M., and Bernstein, H.D. (2005). An unusual signal peptide facilitates late steps in the biogenesis of a bacterial autotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 221–226.
- Tsai, J.C., Yen, M.-R., Castillo, R., Leyton, D.L., Henderson, I.R., and Saier, M.H. (2010). The Bacterial Intimins and Invasins: A Large and Novel Family of Secreted Proteins. *PLoS ONE* 5, e14403.
- Voulhoux, R. (2003). Role of a Highly Conserved Bacterial Protein in Outer Membrane Protein Assembly. *Science* 299, 262–265.
- Walton, T.A., and Sousa, M.C. (2004). Crystal structure of Skp, a prefoldin-like chaperone that protects soluble and membrane proteins from aggregation. *Mol. Cell* 15, 367–374.
- Walton, T.A., Sandoval, C.M., Fowler, C.A., Pardi, A., and Sousa, M.C. (2009). The cavity-chaperone Skp protects its substrate from aggregation but allows independent folding of substrate domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 1772–1777.

Wang, Y., Lu, D., Long, C., and Yan, H. (1998). Interactions between sodium dodecyl sulfate and hydrophobically modified polyacrylamides studied by electron resonance and transmission electron microscopy. *Langmuir* *14*, 2050–2054.

Willems, R., van der Heide, H., Geuijen, C., Locht, C., and Mooi, F. (1994). Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* fim/fha gene cluster: identification of a gene with sequence similarities to haemolysin accessory genes involved in export of FHA. *Mol. Microbiol.* *11*, 337–347.

Xu, Z., Knafels, J.D., and Yoshino, K. (2000). Crystal structure of the bacterial protein export chaperone SecB. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *7*, 1172–1177.

Two-Partner secretion: as simple as it sounds?

Françoise Jacob-Dubuisson^{a,b,c,d,#}, Jérémy Guérin^{a,b,c,d},

Stéphanie Baelen^{d,e}, Bernard Clantin^{d,e}

^aInserm U1019, Lille, France;

^bCNRS UMR 8204, Lille, France;

^cInstitut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France;

^dUniv Lille Nord de France, Lille, France;

^e Interdisciplinary Research Institute, USR3078 CNRS, Villeneuve d'Ascq, France

for correspondence, tel +33 320 87 11 55; fax +33 320 87 11 58;

francoise.jacob@ibl.fr

Abstract

The Two-Partner secretion (TPS) pathway is a branch of type V secretion. TPS systems are dedicated to the secretion across the outer membrane of long proteins that form extended β helices. They are composed of a 'TpsA' cargo protein and a 'TpsB' transporter, which belongs to the Omp85 superfamily. Recent studies have identified TPS systems with additional components. X ray structures are available for the conserved TPS domain of several TpsA proteins and for one TpsB transporter. However, the molecular mechanisms of two-partner secretion remain to be deciphered, and in particular the specific role(s) of the TPS domain and the conformational dynamics of the TpsB transporter. Deciphering the TPS pathway may reveal functional features of other transporters of the Omp85 superfamily.

Introduction

The denomination 'Two-Partner secretion pathway' was coined in 2001 to describe what was then a handful of protein secretion systems homologous to one another and distinct from previously defined pathways in Gram-negative bacteria (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001). It has soon been considered a branch of type V secretion, alongside the autotransporter (AT) pathway (Henderson *et al.*, 2004). This grouping initially based on rather superficial common features between the two pathways has recently found new ground with the discovery that secretion in both of them depends on transporters of the Omp85 superfamily.

Nowadays, hundreds of TPS systems have been identified thanks mostly to large-scale sequencing programs, and an increasing number of them are being characterized. As implied by the name there are two major players in TPS systems, the secreted proteins collectively called TpsA proteins ('the cargos') and their outer membrane partners collectively called

TpsB proteins ('the transporters'). The defining feature of the TpsA proteins is the presence of a conserved, approximately 250-residue-long "TPS" domain located at the N terminus of the mature protein. Most TpsA proteins are long and predicted to form extended solenoid structures, much like classical, type Va AT proteins (Kajava *et al.*, 2001, Kajava and Steven, 2006).

TpsB partners are \approx 60-kDa proteins embedded in the outer membrane. The structure of the TpsB transporter FhaC serves as a model for the TpsB family (Clantin *et al.*, 2007). TpsB proteins are composed of two large moieties. The periplasmic moiety is formed of two successive POTRA (polypeptide transport-associated) domains (Sanchez-Pulido *et al.*, 2003) involved in the recognition of the TpsA cargo (Delattre *et al.*, 2011, Hodak *et al.*, 2006). The C-terminal moiety is embedded in the outer membrane and forms a 16-stranded, anti-parallel β barrel that delimits a channel thought to be the translocation pore for the TpsA partner (Méli *et al.*, 2006). Schematically, the mechanistic model for two-partner secretion goes as follows. Like other signal-peptide-dependent secretion pathways, the first step is the export of the TpsA preprotein across the cytoplasmic membrane by the Sec machinery, coupled with signal-peptide cleavage (Braun *et al.*, 1992, Chevalier *et al.*, 2004, Grass and St Geme, 2000). No Tat-dependent TpsA proteins have been identified thus far, most likely because folded cargos are not compatible with TpsB-mediated translocation across the outer membrane (Guédin *et al.*, 1998). The TpsA protein transits through the periplasm in an extended conformation assisted by chaperones (Baud *et al.*, 2009) and recognizes the periplasmic domain of its cognate TpsB partner, which initiates TpsA translocation through the TpsB pore. The TpsA polypeptide progressively crosses the outer membrane and folds. Additional steps found in a subset of systems include proteolytic maturation of the TpsA protein and/or its release from the cell surface into the milieu (Aoki *et al.*, 2005, Barenkamp and Leininger, 1992, Domenighini *et al.*, 1990, Ward *et al.*, 1998).

TpsB transporters belong to the Omp85 superfamily of protein transporters, ubiquitous proteins found in both the eukaryotic and prokaryotic kingdoms of life (Fairman *et al.*, 2011, Gentle *et al.*, 2005, Hsu & Inoue, 2009, Schleiff *et al.*, 2011) (Fig. 1). Notably, BamA and its orthologs are essential proteins that together with outer membrane lipoproteins form hetero-oligomeric complexes involved in porin assembly in Gram-negative bacteria (for reviews: (Bos *et al.*, 2007, Knowles *et al.*, 2009, Ruiz *et al.*, 2006, Grispstra *et al.*, 2013). Similar proteins are encoded in the genomes of other groups of bacteria with an outer membrane ('diderms'), including Cyanobacteria, Spirochetes, and Deinococcales (Arnold *et al.*, 2010, Bolter *et al.*, 1998, Gentle *et al.*, 2005, Nesper *et al.*, 2008, Reumann *et al.*, 1999). The superfamily also includes transporters in membranes of various organelles of endosymbiotic origin. Thus, Sam50/Tob55 is the central piece of a complex that mediates protein insertion into the outer membrane of mitochondria, and it is likely that Toc75-V (Oep80) has a similar function in chloroplasts (Hsu & Inoue, 2009, Paschen *et al.*, 2003, Patel *et al.*, 2008, Schleiff and Soll, 2005). Toc75-III is the core of a hetero-oligomeric complex involved in translocating proteins from the cytosol across the outer membrane of chloroplasts (Schleiff *et al.*, 2003, Sommer *et al.*, 2011). Similarly, the protein import channel of the trypanosomatid mitochondria outer envelope, called Atom, possibly belongs to the Omp85 superfamily (Harsman *et al.*, 2012, Pusnik *et al.*, 2011, Zarsky *et al.*, 2012). Yet other Omp85 family members are found in prokaryotic-derived membranes of 'secondary' plastids of protists (Bullmann *et al.*, 2010, Schleiff *et al.*, 2011).

The hallmark features of the Omp85 superfamily include the presence of one to several N-terminal POTRA domains involved in protein-protein interactions - substrate recognition or assembly of heteromeric complexes-, and a predicted C-terminal β -barrel domain harbouring conserved motifs (Arnold *et al.*, 2010, Jacob-Dubuisson *et al.*, 2009, Moslavac *et al.*, 2005). The major roles of those proteins are the integration of cargo proteins into a membrane or the

translocation of cargos across a membrane (Fig. 1). Regarding protein translocation, some transporters are specialized in the import of the cargo protein(s), while others mediate export. As for protein integration into the outer membranes of organelles, it occurs by conservative sorting in mitochondria, whereby proteins synthesized in the cytosol and destined to the outer membrane of the organelle are first translocated to the inter-membrane space by a distinct machinery and then integrated into the outer membrane by the Sam complex (Schleiff and Soll, 2005, Sommer *et al.*, 2011). Thus far, it appears that each type of transporter performs either integration or translocation and works in a single direction. However, even this may eventually be questioned.

TpsB transporters are not essential, nor are they part of large complexes, and therefore they appear to be ideally simple models to decipher essential principles of the superfamily (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2009). However, the apparent simplicity of the TPS pathway is somewhat deceptive, and its molecular mechanisms of secretion largely remain to be understood.

Diversity of TPS systems: is “two-partner” a misnomer?

The functions of a limited number of TpsA proteins have been characterized among the hundreds of predicted TpsA proteins encoded in proteobacterial genomes. Although most systems under study are found in pathogenic bacteria, TPS systems are clearly not restricted to pathogens but appear to be involved in interactions between bacteria and their environment in a general sense, either host tissues, substratum, self, or other microorganisms. The functions identified for TpsA proteins include adherence; proteolysis; inhibition of phagocytosis; systemic dissemination of bacteria; intracellular survival; bacterial aggregation and biofilm formation; hemolysis/ cytolysis; contact-dependent growth inhibition; and iron acquisition, which contribute to bacterial fitness or virulence (Anderson *et al.*, 2012, Aoki *et*

al., 2005, Aoki *et al.*, 2010, Cope *et al.*, 1995, Gottig *et al.*, 2009, Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004, Kida *et al.*, 2008, Nelson *et al.*, 2001, Rojas *et al.*, 2002, Serra *et al.*, 2012, Roy *et al.*, 2009, Tala *et al.*, 2008, Vakevainen *et al.*, 2003). Except for the TPS domain, TpsA proteins differ considerably. This very limited overall sequence identity and very diverse sizes - from approximately 700 to more than 5000 residues - likely explain their large functional diversity. Nevertheless, most of them are predicted to form extended β helices, with the β -helical fold serving as a scaffold for the display of motifs or domains with specific functions (Bradley *et al.*, 2001, Kajava and Steven, 2006).

The analysis of *tps* loci has revealed that in many cases the two partners are encoded in an operon (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001) (Fig. 2A). However, several genomes encode more TpsA than TpsB proteins, and therefore it is likely that some TpsB transporters have more than one TpsA cargo. This was shown to be the case for the 86% identical LspA1 and LspA2 of *Haemophilus ducreyi*, both secreted by the LspB transporter, and for FhaB and FhaS of *Bordetella bronchiseptica*, both secreted by FhaC (Julio & Cotter, 2005, Ward *et al.*, 1998, Ward *et al.*, 2004). *Neisseria meningitidis* MC58 harbours genes for five TpsA proteins and two TpsB proteins, classified into three systems based on sequence similarities (van Ulsen & Tommassen, 2006, van Ulsen *et al.*, 2008). The TpsA protein of system #3 is expressed during infection but has no cognate transporter, and therefore it is probably secreted by a TpsB protein of system #1 or #2 (van Ulsen *et al.*, 2008). A more extensive search for *tps* loci in eubacteria has confirmed that loci with *tpsb* and *tpsA* genes in tandem prevail, but several other arrangements are found. Thus, loci containing two pairs of *tpsb tpsA* genes occur (Fig. 2A), as well as loci harbouring a single *tpsb* gene with two *tpsA* genes. The orientations of the *tpsA* genes relative to the *tpsb* – on the same strand or divergent- indicate the possibility of distinct regulations for the two *tpsA* genes (Fig. 2B). Rare cases have also been found with more than two *tpsA* genes in the same locus as a single *tpsb* gene (Fig. 2C). Although whether

the genes are transcribed and functional is unknown in most of those cases, the one-to-one concept for the TPS pathway largely appears to be an oversimplification. It will be interesting to address the specificity of TpsB transporters for their TpsA substrates in a more thorough manner.

An additional layer of diversity comes from the fact that more than two partners are involved in some TPS systems. A first type is exemplified by the HMW1 and HMW2 adhesins of non-typeable *Haemophilus influenzae*, whose genes are found in the *hmw1abc* and *hmw2abc* operons, respectively (Barenkamp and St. Geme, 1994). Secretion of HMW1 and HMW2 requires both the TpsB transporters HMW1B or 2B and the enzymes HMW1C or 2C (St Geme and Grass, 1998). HMW1C has been shown to add mono or di-hexoses to Asn residues in repeated sequence motifs of HMW1 (Gross *et al.*, 2008), thus protecting the adhesin against proteolytic degradation.

Tps operons that encode contact-dependent growth inhibition (CDI) systems also contain additional genes (Aoki *et al.*, 2005). The *cdiBA* genes are followed by a short *cdiI* gene coding for an immunity protein that protects the producing (CDI+) cells from auto-inhibition. The surface-associated CdiA protein mediates direct inter-bacterial interactions between the CDI+ cell and their target bacterial cells, causing growth inhibition of the latter bacteria (Fig. 3). In several species, the C-terminal portions of the CdiA proteins, called CdiA-CTs, and CdiIs are highly variable between strains (Aoki *et al.*, 2010). The CdiA-CTs display distinct growth inhibition activities, which are countered by binding of their cognate CdiI, but not by other CdiIs (Aoki *et al.*, 2010). Some species harbour additional orphan *cdiA-CT/cdiI* cassettes, which are most likely exchanged between CDI systems by homologous recombination, thus expanding the range of toxic activities that can be deployed for intercellular competition (Anderson *et al.*, 2012, Poole *et al.*, 2011). On top of this, an

additional *bcpO* gene is found in most *Burkholderia*'s CDI operons (Anderson *et al.*, 2012), whose product – most likely a lipoprotein- is necessary for the function of the system.

Other TPS systems make use of accessory proteins that are not encoded in the same locus. Thus, several TpsA proteins undergo proteolytic maturation in the course of secretion (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004), although in most cases the maturation protease has not been identified. The maturation of the precursor of the filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*, FhaB takes place at the bacterial surface after secretion by its TpsB transporter, FhaC (Coutte *et al.*, 2001, 2003a, 2003b). The removal of the C-terminal third of FhaB is catalysed by the lipoprotein/AT SphB1 that belongs to the same virulence regulon as *fhaB* and *fhaC* (Antoine *et al.*, 2000). In the absence of SphB1, FhaB is processed into a slightly larger form, presumably by another unidentified maturation protease (Mazar and Cotter, 2006).

This ever-growing list of more-than-two-partners systems illustrates the diversity found in the TPS pathway. However, the TpsA and TpsB partners form the basis of each system, and therefore the self-explanatory 'TPS' denomination appears to hold.

TpsB transporter: structure

The structure of FhaC serves as a model for TpsB transporters (Fig. 4). In this paragraph, we describe briefly the major features of this structure and refer the interested readers to an earlier review for a more detailed analysis (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2009). The N-terminus of FhaC is localized on the extracellular side of the membrane domain and is immediately followed by a 20-residue-long α -helix called H1. The highly charged helix H1 passes through the β -barrel pore and is connected by a 30-residues proline-rich linker to two successive POTRA domains in the periplasm, POTRA1 and POTRA2. POTRA2 directly precedes the β

barrel composed of 16 anti-parallel β -strands, B1 to B16. The surface and periplasmic sides of the barrel are characterized by loops called L1 to L8 and short turns, respectively. The extra long loop L6 that links B11 and B12 is folded as a hairpin into the barrel. The VRGY/Y motif conserved in the Omp85 superfamily (Fig. 4) is located at the tip of the L6 hairpin oriented towards the periplasm. The β barrel is thus occluded by H1 and L6, which are both poorly defined in the structure, indicating that they are mobile. Similarly, the linker between H1 and POTRA1 is not visible in the electron density map, reflecting its high flexibility.

Structure-based multiple sequence alignments of the TPS domains of TpsA proteins and of TpsB proteins have revealed two distinct subfamilies of TPS systems, exemplified by FHA/FhaC and by HMW1A/HMW1B, respectively (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2009, Yeo *et al.*, 2007). Very few residues are conserved among TpsB proteins (Fig. 5). The conserved VRGY/F tetrad in L6 of FhaC is important for the functions of both FhaC and BamA (Delattre *et al.*, 2010, Leonard-Rivera & Misra, 2012). We have also identified a conserved G/FxDxG sequence motif on strand B13 of FhaC (where x are hydrophobic residues) present in other Omp85 family members (Fig. 5). The F/G, D and G residues of the B13 motif are oriented toward the interior of the β -barrel, and in FhaC, D₄₉₂ is close to the L6 loop (Fig. 4) and important for activity (our unpublished data). Thus, we speculate that the two conserved VRGY/F and G/FxDxG motifs contribute to the general mechanism of translocation/insertion in the superfamily.

TpsB transporters: variations around a theme

FhaC and its orthologs in Proteobacteria represent prototypic TpsB proteins with two POTRA domains and a β barrel (Fig. 6). In most of them, both an α -helical segment and a disordered proline-rich segment are predicted to precede the POTRAs, like H1 and the linker

in FhaC. However, such sequences are absent from a few TpsB proteins, such as HMW1B (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2009).

Genes for classical TpsB proteins are also present in Cyanobacteria and in diderm bacteria generally classified as Gram-positive, such as Negativicutes, together with *tpsA* genes (Fig. 6) (Arnold *et al.*, 2010). Note that those genomes harbour a *bamA* gene at a distinct location. In the cyanobacterial TpsB proteins, the two POTRA domains are generally preceded by sequences predicted to form α -helical structure followed by a proline-rich segment, two features reminiscent of H1 and the linker in proteobacterial TpsBs. We have also identified putative proteins where a predicted linker is not preceded by α -helical structure (Fig. 6).

As in other types of secretion pathways, nature has taken advantage of the modular design of those systems to create hybrid proteins. Thus, in a few cases, *tspA* and *tpsB* genes are fused, resulting in a large ORF coding for a protein with a TPS domain at the N terminus, and POTRA domains and a β barrel at the C terminus (Fig. 6). An analogous situation is found in lipolytic patatin-like proteins, present in Proteobacteria, Bacteroidetes, Fusobacteria and Chlorobi (Salacha *et al.*, 2010). In PlpD of *Pseudomonas aeruginosa*, the characteristic patatin sequences are fused to a single POTRA domain followed by a predicted 16-stranded β barrel that mediates secretion of the N-terminal domain. The degeneracy in PlpD of the TpsB motifs described above indicates that the barrel domain of PlpD diverges from *bona fide* TpsBs. To which extent the secretion mechanism differs from classical two-partner secretion remains to be seen. The cargo has no TPS domain and most likely adopts a non- β helix fold. Because the cargo and transporter are fused, the single POTRA domain most likely fulfils a strictly mechanistic role for secretion.

Beyond the structure: conformational dynamics of TpsB transporter

The FhaC structure is thus far the only one of a full-length transporter of the Omp85 superfamily. Nevertheless, the structure does not provide strong clues on the mechanism of transport. Our hypothesis that the β barrel serves as the TpsA-conducting channel is consistent with the pore-forming properties of TpsB proteins (Duret *et al.*, 2008, Könninger *et al.*, 1999, Jacob-Dubuisson *et al.*, 1999, Méli *et al.*, 2006, Surana *et al.*, 2004). However, the channel of FhaC is almost totally obstructed (Fig. 4), and therefore if FHA crosses the outer membrane through this channel, significant conformational changes must occur. To test whether FhaC may adopt two conformations, a closed one like in the crystal structure and an open one with H1 and/or L6 out of the pore, we have tried to obtain its solution structure by using small angle neutron scattering (SANS). Our rationale was that both forms might exist in solution, but that crystal packing might have selected the closed form only. However, preliminary SANS data do not indicate an alternative conformation of FhaC (BC, FJD and others, unpublished). A caveat of this approach is that a minor form might not be detected if its relative abundance is too low. Alternatively, the cargo, which is not present in those experiments, might be required to open the transporter. We have thus turned to other techniques including site-specific labelling, electron paramagnetic resonance and in vivo cross-linking to address the conformational mobility of FhaC. Our preliminary results indicate that FhaC is much more dynamic than suggested by the X ray structure, and in particular that H1 can be found in the periplasm (J. Guerin, unpublished). We thus speculate that H1 plugs the FhaC channel in the resting conformation of the transporter and that it moves out of the pore when FhaC secretes its cargo. Similarly, we have obtained preliminary information that L6 might change conformation in the presence of the cargo (Guédin *et al.*, 2000), but the mutant that yielded this result is inactive, and thus further work is needed to confirm this.

If the TpsB transporter undergoes conformational changes in the course of secretion and if it turns over the cargo proteins - i.e., each copy of transporter secretes successively several

copies of cargo-, then the putative conformational changes should be reversible. Because they occur in the absence of ATP or an electrochemical gradient, conversions between the different conformations should be close to energy-neutral. The question of one versus several rounds of translocation per transporter has not been addressed thus far, but preliminary experiments have indicated that one FhaC might transport several FHA in *B. pertussis* (our unpublished data). In contrast, for HMWB, the C-terminal domain of the HMW1 cargo plugs the channel at the end of translocation (Buscher *et al.*, 2006), and therefore each transporter probably performs a single round of translocation.

In the course of cross-linking experiments we have identified a dimeric form of FhaC. Interestingly, HMW1B was shown earlier to form dimers and tetramers (Li *et al.*, 2007, Surana *et al.*, 2004), and other Omp85 proteins were reported to form homo-oligomers as well (Robert *et al.*, 2006, Schleiff *et al.*, 2003). The FhaC dimers are rather labile and fall apart in non-denaturing detergents in the course of purification. Whether TpsB oligomerisation is permanent or transient and important for function remains unknown.

TPS domain: what is it for?

The N-terminal, approximately 250-residue-long TPS domain is the defining feature of TpsA proteins (Fig. 4). Of note, the pfam domain PF05860 does not encompass the entire TPS domain; furthermore it is wrongly called ‘hemagglutination domain’. TPS domains come in two flavours, like their TpsB partners. In both subtypes, the TPS domain folds into a right-handed parallel β -helix formed of three parallel β sheets, PB1 to PB3, and flanked by structural elements essentially composed of anti-parallel β strands (Clantin *et al.*, 2004, Weaver *et al.*, 2009, Yeo *et al.*, 2007) (Figs. 4 and 7). The interior of the β helix is mostly filled with aliphatic hydrophobic residues and capped at the N terminus by anti-parallel β

sheets as in some AT passenger domains (Khan *et al.*, 2011). The β helix coils become more regular towards the C terminus, with triangular-shaped cross sections of similar sizes (Fig. 7). Although clearly related, each of the two TPS domains subtypes harbours specific sequence motifs found in particular in type I β turns (Yeo *et al.*, 2007). A type I β -turn with the NPNGI motif is conserved between both subtypes, while a second one with the NPNL motif is found in the first subfamily only. These turns contribute to the stabilization of the β helix, and replacement of the first N residue of each motif has drastic effects on secretion (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1997, Schönherr *et al.*, 1993). In addition, a structural motif flanking the β helix – a 4-stranded β sheet composed of two β hairpins or a 3-stranded β sheet prolonged by an α helix (Figs. 4,7)- is most likely involved in the mechanism of secretion in spite of low sequence conservation. Another structural motif is found only in the first subfamily, corresponding to β hairpin $\beta 7/\beta 8$ in Fha30 and followed by the conserved NPNL motif (Fig. 4). Whether these minor structural differences between the two subfamilies cause mechanistic differences remains to be seen.

The TPS domain is essential for secretion in both subfamilies, as shown by targeted deletion or replacement of conserved residues (Grass & St Geme, 2000, Jacob-Dubuisson *et al.*, 1997, Renauld-Mongénie *et al.*, 1996, Schönherr *et al.*, 1993). This has led to the hypothesis that it mediates molecular recognition of the cognate TpsB transporter. Indeed, direct interactions between the TPS domain of TpsA proteins and the POTRA domains of their transporters have been obtained by overlay, coprecipitation and surface plasmon resonance (SPR) (Delattre *et al.*, 2011, Surana *et al.*, 2004, Hodak *et al.*, 2006,). However, the crystal structures do not give clues about the ‘secretion signal’, because interactions between cargo and transporter only occur with the TPS domain unfolded (Delattre *et al.*, 2011, Hodak *et al.*, 2006, Surana *et al.*, 2004). Both conserved and non-conserved residues in two regions of the TPS domain appear to compose the putative secretion signal of FHA, indicating that

specificity between the two partners may be determined by a combination of motifs (Hodak *et al.*, 2006).

Nevertheless, some of the substitutions in the TPS domain abolish secretion without affecting the interactions between the two partners, indicating that the TPS domain's role goes beyond providing determinants for molecular recognition (Hodak *et al.*, 2006). SPR experiments have shown that a non-TPS-containing FHA fragment is also recognized by FhaC's POTRA domains (Delattre *et al.*, 2011). POTRA domains have been proposed to interact with other proteins by β augmentation, by which the POTRA β sheet is prolonged by an extended segment from another protein (Gatzeva-Topalova *et al.*, 2008, Kim *et al.*, 2007, Koenig *et al.*, 2010). Cargo-transporter interactions by β augmentation are compatible with some of the sites of interaction for FHA mapped on FhaC (Delattre *et al.*, 2011). Since most of FHA beyond the TPS domain is composed of short, amphipathic strands suitable for β augmentation, it is reasonable to expect that the POTRA domains of FhaC could recognize other regions of the FHA cargo. Indeed, we have discovered that FhaC can secrete short, non-TPS portions of FHA with a signal-peptide, although at lower efficiencies than the TPS-containing fragment of similar length (our unpublished data). These findings thus question the dogma according to which the TPS is essential to mediate initial interactions with the transporter. Although it has most likely been optimized for molecular recognition of its TpsB partner, this might not be its only function.

Does the TPS domain couple folding and secretion?

The N-terminal position of the TPS domain ensures that it emerges first from the Sec machinery into the periplasm and is thus in a privileged position to engage with the TpsB partner and therefore to reach the cell surface early in the course of secretion. Preliminary

experiments of mechanical unfolding of FHA by atomic force microscopy have indicated that the TPS domain has a good mechanical resistance (FJD, unpublished). Therefore, we propose that the conserved TPS domain structure plays a key role for TpsA folding by forming a stable ‘nucleus’ upon reaching the cell surface, which serves as a template for the progressive assembly of the β helix. The initial folding may be facilitated by the vectorial translocation of the polypeptide, which limits the conformational space to be explored, and by the design of the TPS domain. Such a model would nicely explain the transport of such long proteins across the outer membrane in the absence of an electrochemical or chemical energy source, with the free energy released upon progressive folding of the protein at the cell surface powering secretion. That the folding of the TPS domain is coupled with translocation is supported by the observation that substitutions of key residues for the structure of the TPS domain affect the efficiency of translocation both *in vivo* and *in vitro* (Fan *et al.*, 2012; Hodak *et al.*, 2006).

Another model has been proposed, with translocation of the rest of the polypeptide preceding that of the TPS domain and occurring via the formation of a hairpin in the TpsB pore (Leo *et al.*, 2012, Mazar and Cotter, 2006, Noel *et al.*, 2012). In the hairpin model, the exposed C terminus of the TpsA protein is poised for activity, as would be expected for the toxic domains of CdiA proteins or the active domain of FHA (Aoki *et al.*, 2010, Julio *et al.*, 2009), while the N-terminal TPS domain remains associated with the transporter (Noel *et al.*, 2012). However, the mode of secretion of HMW1 is also difficult to reconcile with such a model, because an N-terminal TPS-containing propiece, HMW1-PP, is naturally cleaved from the rest of the protein in the course of secretion and released into the milieu, while the mature adhesin remains anchored to the HMWB pore by its C terminus (Buscher *et al.*, 2006; St Geme and Yeo, 2009). The hairpin model also implies that the periplasmic interaction between TPS and the POTRAs persists throughout secretion, and thus folding of the TPS domain occurs late. Our findings that the TPS-POTRA interaction is highly dynamic, as

assessed by SPR (Delattre et al., 2011), is at odds with this idea. Rather, the strong conservation of the TPS domain and the observation that it can be secreted in the absence of the rest of the protein in several TPS systems argues in favor of its role for priming secretion. This does not necessarily imply an exposed N terminus for TpsA proteins, as it might re-associate with the bacterial surface in the course of secretion.

Observations that the secreted, folded TPS domain of the TpsA hemolysin ShlA of *Serratia marcescens* triggers the *in vitro* folding of full-length, inactive ShlA* support the role that we propose for the TPS domain (Schiebel *et al.*, 1989, Walker *et al.*, 2004). Accordingly, experiments with the homologous HpmAB system of *Proteus mirabilis* have indicated that the exposed β strand edges of the TPS-containing HpmA265 fragment serve for template-assisted refolding of HpmA* molecules (Weaver *et al.*, 2009).

Finally, a 'TPS first' model might help reconcile conflicting observations regarding TpsA periplasmic intermediates. In the FHA/FhaC system, TPS-containing N-terminal FHA fragments remain secretion-competent for very short periods of time in the absence of FhaC, and soluble periplasmic intermediates cannot be found (Fan *et al.*, 2012, Guédin *et al.*, 1998). In contrast, for the OtpAB system of *Escherichia coli* O157:H7, a *bona fide* OtpA periplasmic intermediate has been described (Choi and Bernstein, 2009). A difference between the two systems is the presence in FhaB of an extended signal-peptide, which slows down the rate of export across the cytoplasmic membrane and/or delays signal-peptide processing (Chevalier *et al.*, 2004). Altogether, we favour the idea that export across the cytoplasmic membrane and secretion across the outer membrane of TpsA proteins are mechanically separate steps, but the time frame for secretion competence of the periplasmic intermediate varies between TpsA proteins. Nevertheless, it cannot be excluded that the TPS domain of very long TpsA proteins such as FhaB engages with the TpsB transporter before the C terminus of the polypeptide has completed Sec-dependent export, with the intervening polypeptide looping in the periplasm.

Do TpsA proteins need chaperones?

If TpsA proteins remain in extended conformations in the periplasm even for short periods of time, their degradation, aggregation or misfolding must be prevented. *In vitro*, long β helical proteins such as ATs and N-terminal derivatives of FHA are not prone to self-aggregation, although they refold slowly after denaturation (Baud *et al.*, 2009, Baud *et al.*, 2011, Hodak *et al.*, 2006, Junker *et al.*, 2006, Junker and Clark, 2009). Slow refolding *in vitro* is most likely linked to the fact that the polypeptide has to explore a much larger conformational space than if folding occurs in a vectorial manner, as is believed to occur *in vivo* (Junker *et al.*, 2009, Peterson *et al.*, 2010; see above for TPS).

When secretion is impaired - e.g. in the absence of the TpsB transporter-, the periplasmic TpsA intermediates do not accumulate in large quantities, suggesting that they undergo proteolytic degradation, as expected for proteins in extended conformations (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1997, St Geme and Grass, 1998). However not all TpsA proteins are degraded to the same extent in the absence of their partners (Choi and Bernstein, 2009, van Ulsen *et al.*, 2008). Periplasmic degradation is likely to be influenced by the rate at which a TpsA protein folds into a protease-resistant conformation and by the proteolytic activity in the periplasm of the host bacterium. We have investigated the involvement of periplasmic chaperones in the FhaB/FhaC system. In *B. pertussis*, the chaperone/protease DegP contributes to the secretion of FHA. *In vitro*, DegP binds to, and degrades, denatured FHA fragments (Baud *et al.*, 2009). We have identified a cytoplasmic membrane-associated form of DegP with high affinity for non-native FHA fragments (Baud *et al.*, 2011). We propose that it works as a 'holding chaperone' for FHA under normal circumstances and as a protease when secretion is impaired, thus facilitating secretion or preventing periplasmic

stress if secretion is defective. Whether our findings will be relevant to the TPS pathway in a more general sense awaits similar analyses of other systems. Note that DegP was found to contribute to the proteolytic degradation of *H. influenzae*'s HMW1 in the periplasm (St Geme and Grass, 1998). The involvement of other types of chaperones cannot be excluded (Hodak *et al.*, 2008).

Type V secretion: missing link(s) found

Type V secretion comprises both the TPS and AT pathways, which were initially grouped together based on common features, including 1° their apparent simplicity – a single component for AT and two for TPS-; 2° their Sec-dependent export across the cytoplasmic membrane; 3° predicted structural similarities among many AT passenger domains and TpsA proteins; 4° the presence of a β barrel domain to transport the functional domain; and 5° a probable independence from cytosolic energy sources. However, the 12-stranded β barrel of AT and 16-stranded β barrel of TpsB are clearly not homologous, leading to a debate on whether AT and TPS may be convergent solutions for the transport of extended proteins that form long β helices or if they are mechanistically related pathways (Henderson *et al.*, 2000, Jacob-Dubuisson *et al.*, 2000, Leo *et al.*, 2012).

More recently, the discovery that BamA and its orthologues mediate the insertion of the AT barrel and possibly also the translocation of its passenger has established clear mechanistic relationships between the TPS and AT pathways, since both BamA and TpsB proteins belong to the Omp85 superfamily (Bodelon *et al.*, 2009, Ieva and Bernstein, 2009, Jain and Goldberg, 2007, Peterson *et al.*, 2010, Sauri *et al.*, 2009, Voulhoux *et al.*, 2003). Nevertheless, the AT and TPS mechanisms necessarily differ to some extent. AT secretion implies coordination between insertion of the barrel and translocation of the passenger, while

in TPS systems, although membrane integration of the TpsB protein likely depends on BamA as well, the steps of TpsB insertion and TspA translocation are separate (Fan *et al.*, 2012, Guédin *et al.*, 1998). In other words, the AT protein is a substrate to be both inserted and secreted, while TpsA proteins are ‘simply’ secreted.

While there is a strong case for the involvement of BamA in the insertion of the AT barrel, the transport of the passenger domain is more contentious. Recently, yet another Omp85 protein, TamA, was found to be involved in AT secretion. TamA (for translocation and assembly module) is a non-essential protein in some Proteobacteria (Selkrig *et al.*, 2012). The TAM complex spans the periplasm and is composed of two proteins, TamA (YtfM) and TamB (YtfN). The latter has a large periplasmic domain of unknown function and a predicted C terminal DUF490 domain including a cytoplasmic membrane anchor. The TAM complex is involved in the secretion of some AT proteins with a β helical passenger domain. Based on those findings the authors have proposed that the BAM complex assembles the β barrel and the TAM complex assists in β helix secretion (Selkrig *et al.*, 2012). How they coordinate their action is unknown. It should be noted that the specific involvement of BAM for known TAM substrates – or vice versa - has not yet been demonstrated.

New discoveries are thus continuously expanding the range of action of Omp85 family members. To conclude we raise questions regarding the versatility of those proteins. In particular, are Omp85 proteins one-function, one-way transporters? Is it possible that Omp85 proteins working as ‘insertases’ serve as ‘translocases’ as well? The role of BamA for contact-dependent inhibition mediated by a class of TPS systems (see above) is interesting in this respect. Thus, the toxic effect of CdiA-CT requires BamA in the outer membrane of the target cell, though not the rest of the Bam machinery, and BamA harboring a substitution that impairs OMP biogenesis remains competent for CDI (Aoki *et al.*, 2008). BamA might serve as a receptor that transmits a signal triggering CDI rather than as a channel for the

translocation of the CdiA-CT fragment into the target bacterium, but the second possibility is more alluring given that BamA belongs to a family that includes translocases such as TpsB transporters. In conclusion it is likely that more diversity of structure and function will be found for Omp85 proteins. Much remains to be learned on this fascinating family.

Acknowledgements

This work is currently supported in our labs by the ANR Blanc grant ‘DYN FHAC’ (2010-2014) to F. J.-D.

References

- Anderson, M.S., Garcia, E.C., Cotter, P.A., 2012. The *Burkholderia bcpAIOB* Genes Define Unique Classes of Two-Partner Secretion and Contact Dependent Growth Inhibition Systems. PLoS Genet. 8, e1002877.
- Antoine, R., Alonso, S., Raze, D., Coutte, L., Lesjean, S., Willery, E., Loch, C., Jacob-Dubuisson, F., 2000. New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in *Bordetella pertussis*. J. Bacteriol. 182, 5902-5905.
- Aoki, S.K., Diner, E.J., de Roodenbeke, C.T., Burgess, B.R., Poole, S.J., Braaten, B.A., Jones, A.M., Webb, J.S., Hayes, C.S., Cotter, P.A., Low, D.A., 2010. A widespread family of polymorphic contact-dependent toxin delivery systems in bacteria. Nature 468, 439-442.
- Aoki, S.K., Malinverni, J.C., Jacoby, K., Thomas, B., Pamma, R., Trinh, B.N., Remers, S., Webb, J., Braaten, B.A., Silhavy, T. J. , Low, D.A., 2008. Contact-dependent growth

- inhibition requires the essential outer membrane protein BamA YaeT as the receptor and the inner membrane transport protein AcrB. *Mol. Microbiol.* 70, 323-340.
- Aoki, S.K., Pamma, R., Hernday, A.D., Bickham, J.E., Braaten, B.A., Low, D.A., 2005. Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Science* 309, 1245-1248.
- Arnold, T., Zeth, K., Linke, D., 2010. Omp85 from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* differs from proteobacterial Omp85 in structure and domain composition. *J. Biol. Chem.* 285, 18003-18015.
- Barenkamp, S.J., Leininger, E., 1992. Cloning, expression and DNA sequence analysis of genes encoding nontypeable *Haemophilus influenzae* highmolecular-weight surface-exposed proteins related to filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 60, 1302-1313.
- Barenkamp, S.J., St. Geme, J.W.I., 1994. Genes encoding high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* are part of gene clusters. *Infect. Immun.* 62, 3320-3328.
- Baud, C., Hodak, H., Willery, E., Drobecq, H., Loch, C., Jamin, M., Jacob-Dubuisson, F., 2009. Role of DegP for two-partner secretion in *Bordetella*. *Mol. Microbiol.* 74, 315-329.
- Baud, C., Gutsche, I., Willery, E., de Paepe, D., Drobecq, H., Gilleron, M., Loch, C., Jamin, M., Jacob-Dubuisson, F., 2011. Membrane-associated DegP in *Bordetella* chaperones a repeat-rich secretory protein. *Mol. Microbiol.* 80, 1625-1636.
- Bodelon, G., Marin, E., Fernandez, L.A., 2009. Role of periplasmic chaperones and BamA (YaeT/Omp85) in folding and secretion of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *J. Bacteriol.* 191, 5169-5179.
- Bolter, B., Soll, J., Schulz, A., Hinnah, S., Wagner, R., 1998. Origin of a chloroplast protein importer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15831-15836.

- Bos, M.P., Robert, V., Tommassen, J., 2007. Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 191-214.
- Bradley, P., Cowen, L., Menke, M., King, J., Berger, B., 2001. Betawrap: Successful prediction of parallel β -helices from primary sequence reveals an association with many microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 14819-14824.
- Braun, V., Hobbie, S., Ondraczek, R., 1992. *Serratia marcescens* forms a new type of cytolysin. *FEMS Microbiol. Lett.* 100, 299-306.
- Brown, N.F., Logue, C.A., Boddey, J.A., Scott, R., Hirst, R.G., Beacham, I.R., 2004. Identification of a novel two-partner secretion system from *Burkholderia pseudomallei*. *Mol. Genet. Genomics* 272, 204-215.
- Bullmann, L., Haarmann, R., Mirus, O., Bredemeier, R., Hempel, F., Maier, U.G., Schleiff, E., 2010. Filling the gap, evolutionarily conserved omp85 in plastids of chromalveolates. *J. Biol. Chem.* 285, 6848-6856.
- Buscher, A.Z., Grass, S., Heuser, J., Roth, R., St Geme, J.W. 3rd, 2006. Surface anchoring of a bacterial adhesin secreted by the two-partner secretion pathway. *Mol. Microbiol.* 61, 470-483.
- Chevalier, N., Moser, M., Koch, H.G., Schimz, K.L., Willery, E., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., Müller, M., 2004. Membrane targeting of a bacterial virulence factor harbouring an extended signal peptide. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 8, 7-18.
- Choi, P.S., Bernstein, H.D., 2009. Sequential translocation of an *Escherichia coli* two-partner secretion pathway exoprotein across the inner and outer membranes. *Mol. Microbiol.* 75, 440-451.
- Clantin, B., Delattre, A.S., Rucktooa, P., Saint, N., Meli, A.C., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., Villeret, V., 2007. Structure of the membrane protein FhaC: a member of the Omp85-TpsB transporter superfamily. *Science* 317, 957-961.

- Clantin, B., Hodak, H., Willery, E., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., Villeret, V., 2004. The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 6194-6199.
- Cope, L.D., Yogev, R., Muller-Eberhard U., Hansen, E.J., 1995. A gene cluster involved in the utilization of both free heme and heme:hemoexin by *Haemophilus influenzae* type b. *J. Bacteriol.* 177, 2644-2653.
- Coutte, L., Alonso, S., Reveneau, N., Willery, E., Quatannens, B., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., 2003a. Role of adhesin release for mucosal colonization by a bacterial pathogen. *J. Exp. Med.* 197, 735-742.
- Coutte, L., Antoine, R., Drobecq, H., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., 2001. Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *EMBO J.* 20, 5040-5048.
- Coutte, L., Willery, E., Antoine, R., Drobecq, H., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., 2003b. Surface anchoring of bacterial subtilisin important for maturation function. *Mol. Microbiol.* 49, 529-539.
- Delattre, A.S., Clantin, B., Saint, N., Locht, C., Villeret, V., Jacob-Dubuisson, F., 2010. Functional importance of a conserved sequence motif in FhaC, a prototypic member of the TpsB/Omp85 superfamily. *FEBS J.* 277, 4755-4765.
- Delattre, A.S., Saint, N., Clantin, B., Willery, E., Locht, C., Villeret, V., Jacob-Dubuisson, F., 2011. Substrate recognition by the POTRA domains of TpsB transporter FhaC. *Mol. Microbiol.* 81, 99-112.
- Domenighini, M., Relman, D., Capiou, C., Falkow, S., Prugnola, A., Scarlato, V., Rappuoli, R., 1990. Genetic characterization of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor. *Mol. Microbiol.* 4, 787-800.
- Duret, G., Szymanski, M., Choi, K.J., Yeo, H.J., Delcour, A.H., 2008. The TpsB translocator

- HMW1B of *Haemophilus influenzae* forms a large conductance channel. J. Biol. Chem. 283, 15771-15778.
- Fairman, J.W., Noinaj, N., Buchanan, S.K., 2011. The structural biology of beta-barrel membrane proteins: a summary of recent reports. Curr. Opin. Struct. Biol. 21, 523-531.
- Fan, E., Fiedler, S., Jacob-Dubuisson, F., Muller, M., 2012. Two-partner secretion of gram-negative bacteria: a single beta-barrel protein enables transport across the outer membrane. J. Biol. Chem. 287, 2591-2599.
- Gatzeva-Topalova, P.Z., Walton, T.A., Sousa, M.C., 2008. Crystal Structure of YaeT: Conformational Flexibility and Substrate Recognition. Structure 16, 1873-1881.
- Gentle, I.E., Burri, L., Lithgow, T. 2005. Molecular architecture and function of the Omp85 family of proteins. Mol. Microbiol. 58, 1216-1225.
- Gottig, N., Garavaglia, B.S., Garofalo, C.G., Orellano, E.G., Ottado, J., 2009. A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. PLoS ONE 4, e4358.
- Grass, S., St Geme, J.W. 3rd, 2000. Maturation and secretion of the non-typable *Haemophilus influenzae* HMW1 adhesin: roles of the N-terminal and C-terminal domains. Mol. Microbiol. 36, 55-67.
- Gross, J., Grass, S., Davis, A.E., Gilmore-Erdmann, P., Townsend, R.R., St Geme 3rd, J.W., 2008. The *Haemophilus influenzae* HMW1 adhesin is a glycoprotein with an unusual N-linked carbohydrate modification. J. Biol. Chem. 283, 26010-26015.
- Grijpstra, J., Arenas, J., Rutten, L., Tommassen, J., Autotransport secretion: varying on a theme. Res. Microbiol., [in press](#).
- Guédin, S., Willery, E., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., 1998. Evidence that a globular conformation is not compatible with FhaC-mediated secretion of the *Bordetella*

- pertussis* filamentous haemagglutinin. Mol. Microbiol. 29, 763-774.
- Guédin, S., Willery, E., Tommassen, J., Fort, E., Drobecq, H., Loch, C., Jacob-Dubuisson, F., 2000. Novel topological features of FhaC, the outer membrane transporter involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. J. Biol. Chem. 275, 30202-30210.
- Harsman, A., Niemann, M., Pusnik, M., Schmidt, O., Burmann, B.M., Hiller, S., Meisinger, C., Schneider, A., Wagner, R., 2012. Bacterial Origin of a Mitochondrial Outer Membrane Protein Translocase: new perspectives from comparative single channel electrophysiology. J. Biol. Chem. 287, 31437-31445.
- Henderson, I.R., Cappello, R., Nataro, J.P., 2000. Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion. Trends Microbiol. 8, 529-532.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C., Ala'Aldeen, D., 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68, 692-744.
- Hodak, H., Clantin, B., Willery, E., Villeret, V., Loch, C., Jacob-Dubuisson, F., 2006. Secretion signal of the filamentous haemagglutinin, a model two-partner secretion substrate. Mol. Microbiol. 61, 368-382.
- Hodak, H., Wohlkonig, A., Smet-Nocca, C., Drobecq, H., Wieruszkeski, J.M., Senechal, M., Landrieu, I., Loch, C., Jamin, M., Jacob-Dubuisson, F., 2008. The peptidyl-prolyl isomerase and chaperone Par27 of *Bordetella pertussis* as the prototype for a new group of parvulins. J. Mol. Biol. 376, 414-426.
- Hsu, S.C., Inoue, K., 2009. Two evolutionarily conserved essential beta-barrel proteins in the chloroplast outer envelope membrane. Biosci. Trends 3, 168-178.
- Ieva, R., Bernstein, H.D., 2009. Interaction of an autotransporter passenger domain with BamA during its translocation across the bacterial outer membrane. Proc. Natl. Acad.

- Sci. USA 106, 19120-19125.
- Jacob-Dubuisson, F., Buisine, C., Willery, E., Renauld-Mongenie, G., Locht, C., 1997. Lack of functional complementation between *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and *Proteus mirabilis* HpmA hemolysin secretion machineries. J. Bacteriol. 179, 775-783.
- Jacob-Dubuisson, F., El-Hamel, C., Saint, N., Guedin, S., Willery, E., Molle, G., Locht, C., 1999. Channel formation by FhaC, the outer membrane protein involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. J. Biol. Chem. 274, 37731-37735.
- Jacob-Dubuisson, F., Fernandez, R., Coutte, L., 2004. Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. Biochim. Biophys. Acta 1694, 235-257.
- Jacob-Dubuisson, F., Locht, C., Antoine, R., 2001. Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. Mol. Microbiol. 40, 306-313.
- Jacob-Dubuisson, F., Rudy, A., Locht, C., 2000. Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion: response. Trends Microbiol. 8, 534-535.
- Jacob-Dubuisson, F., Villeret, V., Clantin, B., Delattre, A.S., Saint, N., 2009. First structural insights into the TpsB/Omp85 superfamily. Biol. Chem. 390, 675-684.
- Jain, S., Goldberg, M.B., 2007. Requirement for YaeT in the outer membrane assembly of autotransporter proteins. J. Bacteriol. 189, 5393-5398.
- Julio, S.M., Cotter, P.A., 2005. Characterization of the filamentous hemagglutinin-like protein FhaS in *Bordetella bronchiseptica*. Infect. Immun. 73, 4960-4971.
- Julio, S.M., Inatsuka, C. S, Mazar, J. Dieterich, C., Relman, D.A., Cotter, P.A. 2009. Natural-host animal models indicate functional interchangeability between the filamentous haemagglutinins of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica* and reveal a

- role for the mature C-terminal domain, but not the RGD motif, during infection. *Mol Microbiol* 71(6):1574-1590.
- Junker, M., Besingi, R.N., Clark, P.L., 2009. Vectorial transport and folding of an autotransporter virulence protein during outer membrane secretion. *Mol. Microbiol.* 71, 1323-1332.
- Junker, M., Clark, P.L., 2009. Slow formation of aggregation-resistant beta-sheet folding intermediates. *Proteins* 78, 812-824.
- Junker, M., Schuster, C.C., McDonnell, A.V., Sorg, K.A., Finn, M.C., Berger, B., Clark, P.L., 2006. Pertactin beta-helix folding mechanism suggests common themes for the secretion and folding of autotransporter proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 4918-4923.
- Kajava, A.V., Cheng, N., Cleaver, R., Kessel, M., Simon, M.N., Willery, E., Jacob-Dubuisson, F., Locht, C., Steven, A.C., 2001. Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins. *Mol. Microbiol.* 42, 279-292.
- Kajava, A.V., Steven, A.C., 2006. The turn of the screw: variations of the abundant beta-solenoid motif in passenger domains of Type V secretory proteins. *J. Struct. Biol.* 155, 306-315.
- Khan, S., Mian, H.S., Sandercock, L.E., Chirgadze, N.Y., Pai, E.F., 2011. Crystal structure of the passenger domain of the *Escherichia coli* autotransporter EspP. *J. Mol. Biol.* 413, 985-1000.
- Kida, Y., Higashimoto, Y., Inoue, H., Shimizu, T., Kuwano, K., 2008. A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF-kappaB through protease-activated receptors. *Cell. Microbiol.* 10, 1491-1504.
- Kim, S., Malinverni, J.C., Sliz, P., Silhavy, T.J., Harrison, S.C., Kahne, D., 2007. Structure

- and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. *Science* 317, 961-964.
- Knowles, T.J., Scott-Tucker, A., Overduin, M., Henderson, I.R., 2009. Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 206-214.
- Koenig, P., Mirus, O., Haarmann, R., Sommer, M., Sinning, I., Schleiff, E., Tews, I., 2010. Conserved properties of POTRA domains derived from cyanobacterial OMP85. *J. Biol. Chem.* 285, 18016-18024.
- Könninger, U.W., Hobbie, S., Benz, R., Braun, V., 1999. The haemolysin-secreting ShlB protein of the outer membrane of *Serratia marcescens* : determination of surface-exposed residues and formation of ion-permeable pores by ShlB mutants in artificial lipid bilayer membranes. *Mol. Microbiol.* 32, 1212-1225.
- Leo, J. C., Grin, I., Linke, D., 2012. Type V secretion: mechanisms of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 367, 1088-1101.
- Leonard-Rivera, M., Misra, R., 2012. Conserved Residues of the Putative L6 Loop of *Escherichia coli* BamA Play a Critical Role in the Assembly of beta-Barrel Outer Membrane Proteins, Including That of BamA Itself. *J. Bacteriol.* 194, 4662-4668.
- Li, H., Grass, S., Wang, T., Liu, T., St Geme 3rd, J.W., 2007. Structure of the *Haemophilus influenzae* HMW1B translocator protein: evidence for a twin pore. *J. Bacteriol.* 189, 7497-7502.
- Mazar, J., Cotter, P.A., 2006. Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Mol. Microbiol.* 62, 641-654.
- Méli, A.C., Hodak, H., Clantin, B., Loch, C., Molle, G., Jacob-Dubuisson, F., Saint, N., 2006. Channel properties of TpsB transporter FhaC point to two functional domains

- with a C-terminal protein-conducting pore. *J. Biol. Chem.* 281, 158-166.
- Moslavac, S., Mirus, O., Bredemeier, R., Soll, J., von Haeseler, A., Schleiff, E., 2005. Conserved pore-forming regions in polypeptide-transporting proteins. *FEBS J.* 272, 1367-1378.
- Nelson, K.M., Young, G.M., Miller, V.L., 2001. Identification of a locus involved in systemic dissemination of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 69, 6201-6208.
- Nesper, J., Brosig, A., Ringler, P., Patel, G. J., Muller, S.A., Kleinschmidt, J.H., Boos, W., Diederichs, K., Welte, W., 2008. Omp85 Tt from *Thermus thermophilus* HB27: an ancestral type of the Omp85 protein family. *J. Bacteriol.* 190, 4568-4575.
- Noel, C., Mazar, J., Melvin, J.A., Sexton, J., Cotter, P.A., 2012. The prodomain of the *Bordetella* two-partner secretion pathway protein FhaB remains intracellular yet affects the conformation of the mature C-terminal domain. *Mol. Microbiol.* 86, 988-1006.
- Paschen, S.A., Waizenegger, T., Stan, T., Preuss, M., Cyrklaff, M., Hell, K., Rapaport, D., Neupert, W., 2003. Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature* 426, 862-866.
- Patel, R., Hsu, S.C., Bedard, J., Inoue, K., Jarvis, P., 2008. The Omp85-related chloroplast outer envelope protein OEP80 is essential for viability in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 148, 235-245.
- Peterson, J.H., Tian, P., Ieva, R., Dautin, N., Bernstein, H.D., 2010. Secretion of a bacterial virulence factor is driven by the folding of a C-terminal segment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 17739-17744.
- Poole, S.J., Diner, E.J., Aoki, S.K., Braaten, B.A., t'Kint de Roodenbeke, C., Low, D.A., Hayes, C.S., 2011. Identification of functional toxin/immunity genes linked to contact-dependent growth inhibition CDI and rearrangement hotspot Rhs systems. *PLoS*

- Genet. 7, e1002217.
- Pusnik, M., Schmidt, O., Perry, A.J., Oeljeklaus, S., Niemann, M., Warscheid, B., Lithgow, T., Meisinger, C., Schneider, A., 2011. Mitochondrial preprotein translocase of trypanosomatids has a bacterial origin. *Curr. Biol.* 21, 1738-1743.
- Renauld-Mongénie, G., Cornette, J., Mielcarek, N., Menozzi, F.D., Loch, C., 1996. Distinct roles of the N-terminal and the C-terminal precursor domains in the biogenesis of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J. Bacteriol.* 178, 1053-1060.
- Reumann, S., Davila-Aponte, J., Keegstra, K., 1999. The evolutionary origin of the protein-translocating channel of chloroplastic envelope membranes: identification of a cyanobacterial homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 784-789.
- Robert, V., Volokhina, E.B., Senf, F., Bos, P., M., Van Gelder, P., Tommassen, J., 2006. Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif. *PLoS Biol.* 4; e377.
- Rojas, C.M., Ham, J.H., Deng, W. L., Doyle, J.J., Collmer, A., 2002. HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana glauca* seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 13142-13147.
- Roy, K., Hilliard, G.M., Hamilton, D.J., Luo, J., Ostmann, M.M. Fleckenstein J.M., 2009. Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between flagella and host cells. *Nature* 457, 594-598.
- Ruiz, N., Kahne, D., Silhavy, T.J., 2006. Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 57-66.
- Salacha, R., Kovacic, F., Brochier-Armanet, C., Wilhelm, S., Tommassen, J., Filloux, A., Voulhoux, R., Bleves, S., 2010. The *Pseudomonas aeruginosa* patatin-like protein

- PlpD is the archetype of a novel Type V secretion system. *Environ. Microbiol.* 12, 1498-1512.
- Sanchez-Pulido, L., Devos, D., Genevrois, S., Vicente, M., Valencia, A., 2003. POTRA: a conserved domain in the FtsQ family and a class of beta-barrel outer membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* 28, 523-526.
- Sauri, A., Soprova, Z., Wickstrom, D., de Gier, J.W., Van der Schors, R.C., Smit, A.B., Jong, W.S., Luirink, J., 2009. The Bam (Omp85) complex is involved in secretion of the autotransporter haemoglobin protease. *Microbiology* 155, 3982-3991.
- Schiebel, E., Schwarz, H., Braun, V., 1989. Subcellular localization and unique secretion of the hemolysin of *Serratia marcescens*. *J. Biol. Chem.* 264, 16311-16320.
- Schleiff, E., Maier, U.G., Becker, T., 2011. Omp85 in eukaryotic systems: one protein family with distinct functions. *Biol. Chem.* 392, 21-27.
- Schleiff, E., Soll, J., 2005. Membrane protein insertion: mixing eukaryotic and prokaryotic concepts. *EMBO Rep.* 6, 1023-1027.
- Schleiff, E., Soll, J., Kuchler, M., Kuhlbrandt, W., Harrer, R., 2003. Characterization of the translocon of the outer envelope of chloroplasts. *J. Cell Biol.* 160, 541-551.
- Schonherr, R., Tsolis, R., Focareta, T., Braun, V., 1993. Amino acid replacements in the *Serratia marcescens* haemolysin ShIA define sites involved in activation and secretion. *Mol. Microbiol.* 9, 1229-1237.
- Selkrig, J., Mosbahi, K., Webb, C.T., Belousoff, M.J., Perry, A.J., Wells, T.J., Morris, F., Leyton, D.L., Totsika, M., Phan, M.D., Celik, N., Kelly, M., Oates, C., Hartland, E.L., Robins-Browne, R.M., Ramarathinam, S.H., Purcell, A.W., Schembri, M.A., Strugnell, R.A., Henderson, I.R., Walker, D., Lithgow, T., 2012. Discovery of an archetypal protein transport system in bacterial outer membranes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 506-510, S501.

- Serra, D.O., Conover, M.S., Arnal, L., Sloan, G.P., Rodriguez, M.E., Yantorno, O.M., Deora, R., 2012. FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. PLoS ONE 6, e28811.
- Sommer, M.S., Daum, B., Gross, L.E., Weis, B.L., Mirus, O., Abram, L., Maier, U.G., Kuhlbrandt, W., Schleiff, E., 2011. Chloroplast Omp85 proteins change orientation during evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 13841-13846.
- St Geme, J.W., 3rd, Grass, S., 1998. Secretion of the *Haemophilus influenzae* HMW1 and HMW2 adhesins involves a periplasmic intermediate and requires the HMWB and HMWC proteins. Mol. Microbiol. 27, 617-630.
- St Geme, J.W., 3rd, Yeo, H.J., 2009. A prototype two-partner secretion pathway: the *Haemophilus influenzae* HMW1 and HMW2 adhesin systems. Trends Microbiol. 17, 355-360.
- Surana, N.K., Grass, S., Hardy, G.G., Li, H., Thanassi, D.G., St Geme, J.W. 3rd, 2004. Evidence for conservation of architecture and physical properties of Omp85-like proteins throughout evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 14497-14502.
- Tala, A., Progidia, C., De Stefano, M., Cogli, L., Spinosa, M.R., Bucci, C., Alifano, P., 2008. The HrpB-HrpA two-partner secretion system is essential for intracellular survival of *Neisseria meningitidis*. Cell. Microbiol. 10: 2461-2482.
- Vakevainen, M., Greenberg, S., Hansen, E.J., 2003. Inhibition of phagocytosis by *Haemophilus ducreyi* requires expression of the LspA1 and LspA2 proteins. Infect. Immun. 71, 5994-6003.
- van Ulsen, P., Rutten, L., Feller, M., Tommassen, J., van der Ende, A., 2008. Two-partner secretion systems of *Neisseria meningitidis* associated with invasive clonal complexes. Infect. Immun. 76, 4649-4658.

- van Ulsen, P., Tommassen, J., 2006. Protein secretion and secreted proteins in pathogenic *Neisseriaceae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 292-319.
- Voulhoux, R., Bos, M.P., Geursten, J., Mols, M., Tommassen, J. 2003. Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane assembly. *Science* 299, 262-265.
- Walker, G., Hertle, R., Braun, V., 2004. Activation of *Serratia marcescens* hemolysin through a conformational change. *Infect. Immun.* 72, 611-614.
- Ward, C.K., Lumbley, S.R., Latimer, J.L., Cope, L.D., Hansen, E.J., 1998. *Haemophilus ducreyi* secretes a filamentous hemagglutinin-like protein. *J. Bacteriol.* 180, 6013-6022.
- Ward, C.K., Mock, J.R., Hansen, E.J., 2004. The LspB protein is involved in the secretion of the LspA1 and LspA2 proteins by *Haemophilus ducreyi*. *Infect. Immun.* 72, 1874-1884.
- Weaver, T.M., Hocking, J.M., Bailey, L.J., Wawrzyn, G.T., Howard, D.R., Sikkink, L.A., Ramirez-Alvarado, M., Thompson, J.R., 2009. Structural and functional studies of truncated hemolysin a from *Proteus mirabilis*. *J. Biol. Chem.* 284, 22297-22309.
- Yeo, H. J., Yokoyama, T., Walkiewicz, K., Kim, Y., Grass, S., St Geme, 3rd J.W., 2007. The structure of the *Haemophilus influenzae* HMW1 pro-piece reveals a structural domain essential for bacterial two-partner secretion. *J. Biol. Chem.* 282, 31076-31084.
- Zarsky, V., Tachezy, J., Dolezal, P., 2012. Tom40 is likely common to all mitochondria. *Curr. Biol.* 22, R479-481; author reply R481-472.

Figure legends

Figure 1. Schematic representation of Omp85 superfamily proteins (in dark blue) and their major functions in Gram-negative bacteria (A-C), mitochondria (D-E) and chloroplasts (F). A. Two-partner secretion pathway. The TpsB protein secretes to the extracellular milieu its

cognate TpsA partner. B. BamA is the core of the essential BAM complex (β -Barrel Assembly Machinery) responsible for integration of outer membrane proteins. C. TamA and TamB form the Translocation and Assembly Module (TAM) complex involved in the transport and assembly of autotransporters (ATs). D. Pre-proteins are translocated to mitochondria via the Translocase of the Outer Membrane (TOM) complex. The Sorting and Assembly of Mitochondria (SAM) complex, which includes the Omp85 protein Sam50, is required for the insertion of β -barrel OMPs and possibly of some α -helical components of the TOM complex. E. Mitochondria of trypanosomatids lack a *bona fide* Tom40. Instead, the Archaeic Translocase of the Outer Mitochondrial membrane (ATOM) fulfils this function. Its phylogenetic origin remains debated, and sequence alignments have revealed a truncated barrel lacking some of the motifs of the Omp85 superfamily. F. Toc75-III is the core of the TOC complex required for the translocation into chloroplasts of cytosolically synthesized proteins, whereas Toc75-V is part of a complex involved in the assembly of outer membrane proteins. OM, outer membrane; IM, inner membrane; P, periplasm; IMS, intermembrane space; SecYEG, translocation channel complex of the Sec secretory system; OMPs, outer membrane proteins; ATs, autotransporters. Adapted from (Fairman *et al.*, 2011; Knowles *et al.*, 2009; Schleiff and Soll, 2005).

Figure 2. Organization of *tps* loci. A. Most *tps* loci harbour a pair of *tpsA* and *tpsB* genes, frequently in the order *BA*. In rare instances two *BA* pairs are found in tandem. This is exemplified by *Pasteurella multocida subsp. multocida* Pm70 (PM0056 to PM0059) (first line). The *A* and *tpsB* genes are not necessarily contiguous, as *fhaB* and *fhaC* in *Bordetella pertussis*, separated by four intervening genes coding for the pilus assembly machinery (second line). B. Several *A* genes can be found for a single *B* gene. They are either in tandem on the same strand as in *Minibacterium massiliensis* (mma_1615 to mma_1617), or with the second *A* separated from the complete pair by intervening genes as in *Arcobacter nitrofigilis*

(Arnit_2074, Arnit_2075, Arnit_2080) (first line). A *tpsB* gene with two *tpsA* genes on the same strand is found in *Burkholderia ambifaria* AMMD (Bamb_5443, Bamb_5444 and Bamb_5446) or in *Ralstonia eutropha* JMP134 (Reut_A2930, Reut_A2932, Reut_A2933) (second line). Alternatively, the second A is on the opposite strand as in *Burkholderia phymatum* (Bphy_5860 to Bphy_5862) (third line), or separated by intervening genes, as in *Neisseria meningitidis* H44/76 (NMBH4476_1684, NMBH4476_1685 and NMBH4476_1688) (fourth line). C. In rare cases, one B is found close to several As, as in *Pusillimonas* sp. T7-7 (PT7_0253, PT7_0268, PT7_0272, PT7_0286, PT7_0287) and in *Anabaena* sp. PCC7120 (all5116, all5104 to all5108 and all5110 to all5115). *tpsB* genes are represented by black arrows, *tpsA* genes by white arrows, and other genes by grey arrows. Genes are approximately drawn to scale. Parentheses indicate blocks absent from some of the loci described.

Figure 3. Model of the CDI system in *Escherichia coli*. CdiA crosses the inner membrane (IM) through Sec and is secreted to the cell surface of the inhibitor cell (shown at the bottom) through its TpsB partner CdiB (1). Cell-to-cell contact between CdiA and BamA in the outer membrane of the target bacterium (top of the figure) leads to the delivery of the toxic C-terminal moiety of CdiA (2). The most likely scenario is that the toxic moiety crosses the cell envelope through BamA and AcrB, gaining access to its specific cellular target (in this case, tRNA) and thus causing growth inhibition (3a). Alternatively, following cell-to-cell contact a toxic signal is transmitted into the target cell. Cells producing the cognate immunity protein CdiI that inactivates the delivered toxin can grow (3b). Based on (Aoki *et al.*, 2010).

Figure 4. A, Ribbon representations of Fha30 and FhaC at the same scale. This shows that the size of the Fha30 β helix is incompatible with translocation in folded conformation through the TpsB pore as it is in the crystal structure. The capping and the extra-helix motifs of the

TPS domain are coloured red and blue, respectively. The FhaC β -barrel represented by a cutaway view is obstructed by the α helix H1 and the loop L6 coloured red and green, respectively. The tip of L6 containing the VRGY/F motif is coloured pink. The conserved F/GxDxG motif of β -barrel strand β 13 is coloured blue. Periplasmic domains POTRA1 and POTRA2 are coloured cyan and purple, respectively. The linker between H1 and POTRA1 and the loop L5 are shown as dashed lines. The image was generated with PyMOL. B, Superposition of three coils of the TpsA proteins HpmA (blue), FHA (green) and HMWIA (pink). The structural elements flanking the β helix have been removed for the superposition. Because HpmA265, Fha30 and HMW1A-PP protein comprise 6, 9 or 12 coils, respectively, their length differ considerably, but their cross-sections have similar shapes and dimensions. The lengths of the loops also vary among TpsA proteins. The small view in the left corner shows portions of the β helices used for the superposition.

Figure 5. Sequence alignments of representative TpsBs and other Omp85 proteins. The first and second blocks of sequences contain TpsB proteins of the first and second TpsB subfamilies, respectively. Various non-TpsB members of the Omp85 superfamily are shown in the third block. The region of FhaC from the end of B11 to the end of B13 has been aligned with that of other Omp85 proteins to show the conserved sequences motifs VRGY/F and F/GxDxG (coloured red). The hydrophobic residues of the F/GxDxG oriented to the lipid bilayer are in green. Gly is most frequently found at the first position of this motif in the FhaC subfamily of TpsBs, while Phe is systematically present in the HMWB subfamily.

Figure 6. Schematic representation of prototypical TpsBs and TpsB variants. Note that most of the latter proteins are only predicted from genomic sequences. The β -barrel domain is represented by a dark grey box, with grey rectangles inside indicating the motifs conserved in the Omp85 family. The POTRA domains are represented by ovals. A. The two subtypes of

TpsB are represented, with vertical red and blue lines indicating the positions of specific motifs found in each subtype. Representative members of the first subtype (first line) include FHAC_BORPE (*B. pertussis*), HLYB_SERMA (*S. marcescens*) and D2RM30_ACIFV (*Acidaminococcus fermentans*); representatives of the second subtype (second line) include HXUB2_HAEIF (*H. influenzae*), Q29XT8_ECOLX (*E. coli*) and D1BNY4_VEIPT (*Veillonella parvula*). In Proteobacteria most TpsBs harbour an N-terminal α helix (black box) followed by a Pro-rich region called linker in FhaC (black line). However, these elements are missing in a few cases (represented by the use of parentheses), such as B2PUR1_PROST (*Providencia stuartii*), B4EST2_PROMH (*P. mirabilis*), C4T073_YERIN (*Yersinia intermedia*) and HMW1B (*H. influenzae*), which have neither elements, or F0BGV1_9XANT (*Xanthomonas vesicatoria*), which has a predicted linker only. B. TpsBs of Cyanobacteria. The β -barrel domains are intermediate between those of Proteobacteria's TpsB and BamA barrels, and their POTRA2 (brown oval) are divergent from those of both Proteobacteria and Negativicutes (Arnold *et al.*, 2010). A representative of this group is B1WPM2_CYAA5 (*Cyanothece sp.*). In a few cases such as B2IZS4_NOSP7 (*Nostoc punctiforme*), A8ZPR7_ACAM1 (*Acaryochloris marina*) and Q8DLP0_THEEB (*Thermosynechococcus elongatus*), the predicted N-terminal helix is missing (hence the parentheses), but the Pro-rich region is present. C. Atypical TpsB variants. A long N-terminal α helical region is predicted in Q6Y659_BURPE (*Burkholderia pseudomallei*) (Brown *et al.*, 2004) (first line). TpsA-TpsB fusions are predicted with two POTRAs and a β barrel or with a barrel only for the cyanobacterial proteins Q10YU5, Q10YU7 and Q10YU7 (*Trichodesmium erythraeum*) (second line), or for B1FW34_9BURK (*Burkholderia graminis*) (third line), respectively. The TPS domain shown in pale green is followed by a region predicted to be rich in β structure. Most patatin-TpsB fusions (see text) harbour a single POTRA domain, such as in Q9HYQ6_PSEAE (*Pseudomonas aeruginosa*) and Q7MHW3_VIBVY (*Vibrio*

vulnificus) (line 4). A few examples are found with two POTRA domains, including Q8KC70_CHLTE (*Chlorobium tepidum*), A1BI18_CHLPD (*Chlorobium phaeobacteroides*) and Q3ATV9_CHLCH (*Chlorobium chlorochromatii*). Note that the POTRA(s) and VRGY motifs are divergent from those of Proteobacteria, and the F/GxDxG motif is missing.

FIG 1

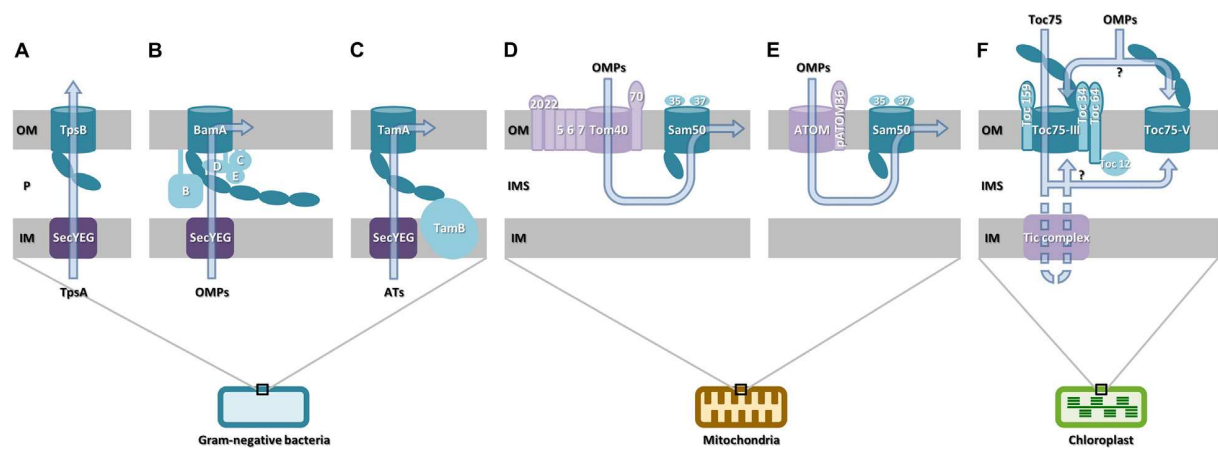
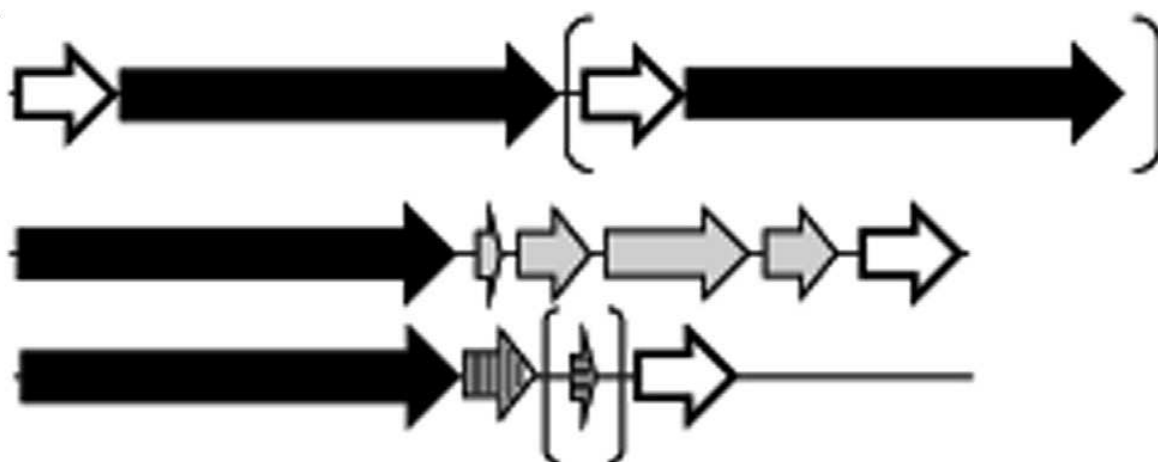
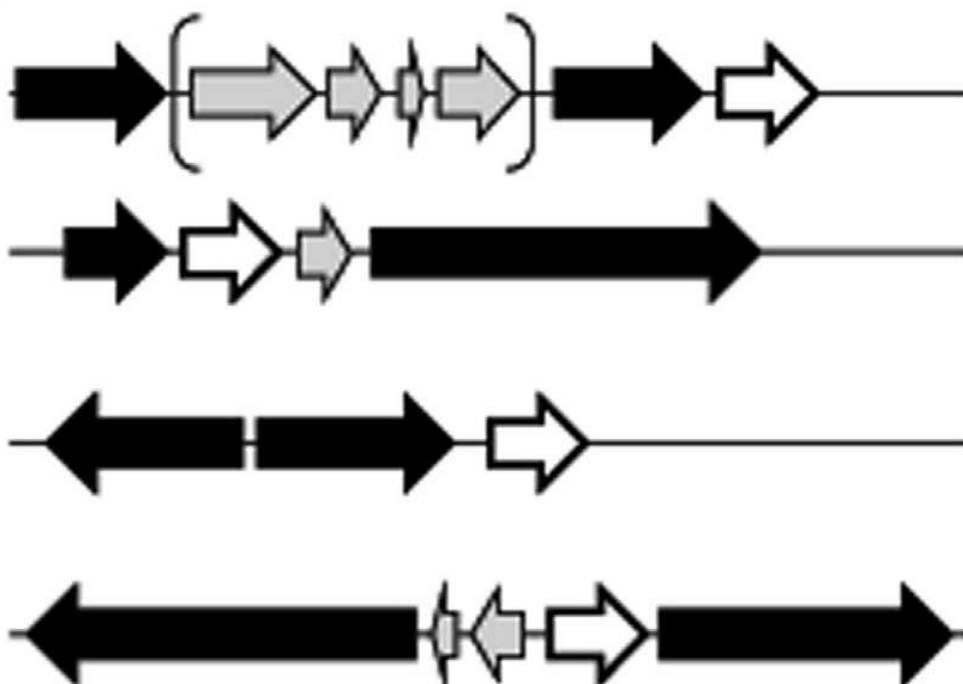


FIG 2

A



B



C

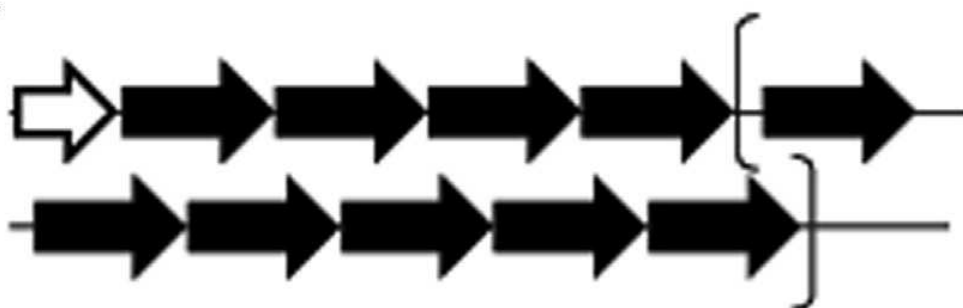


Fig 3

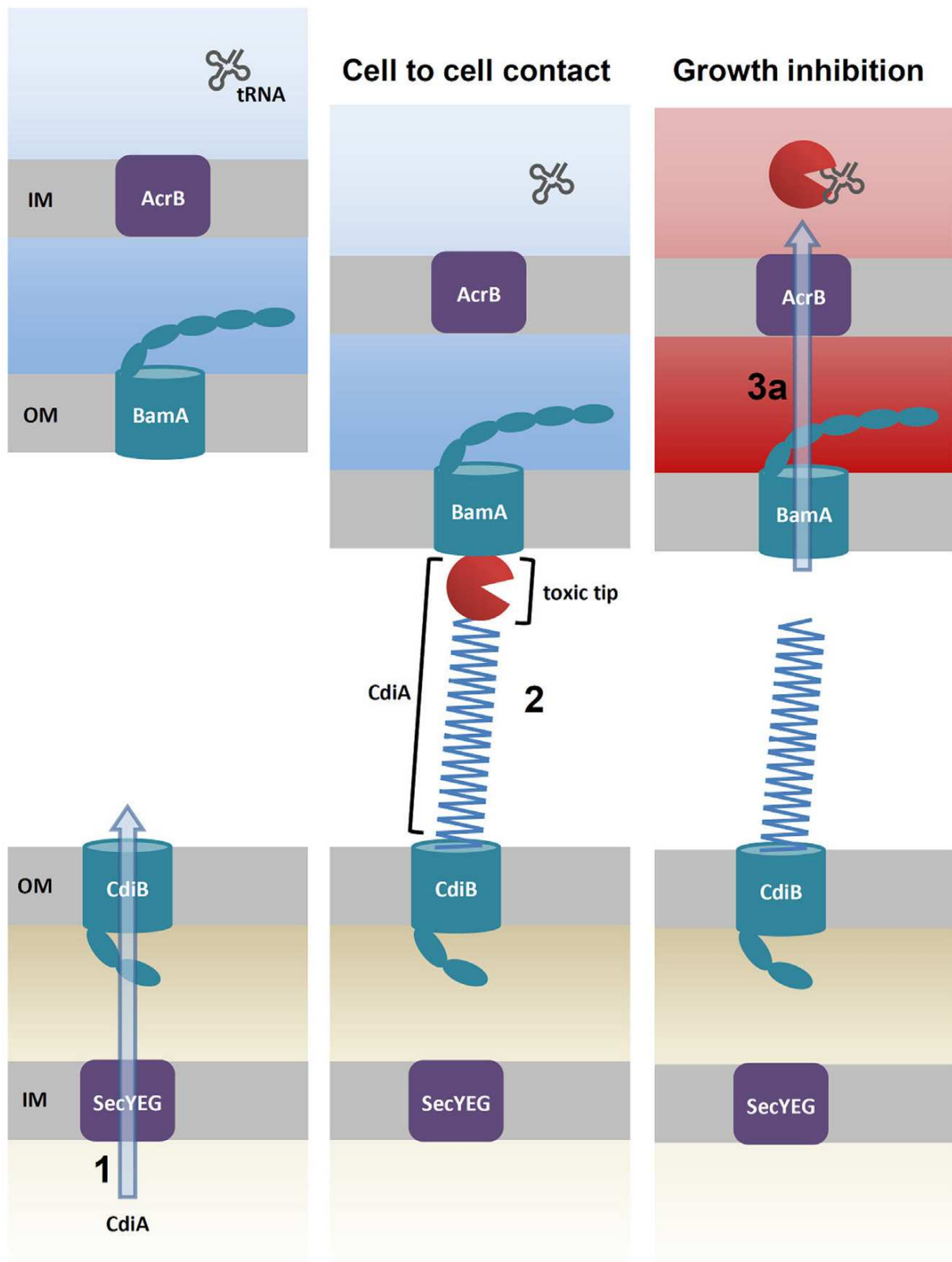


Fig 4

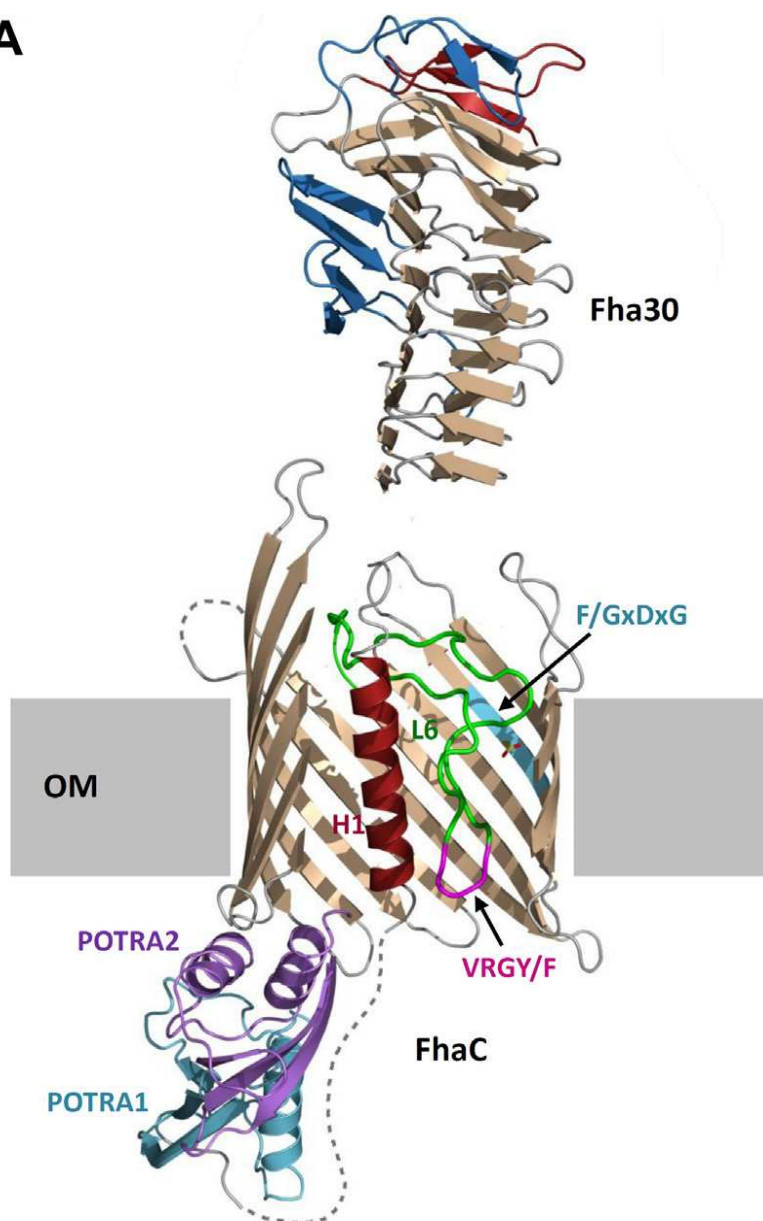
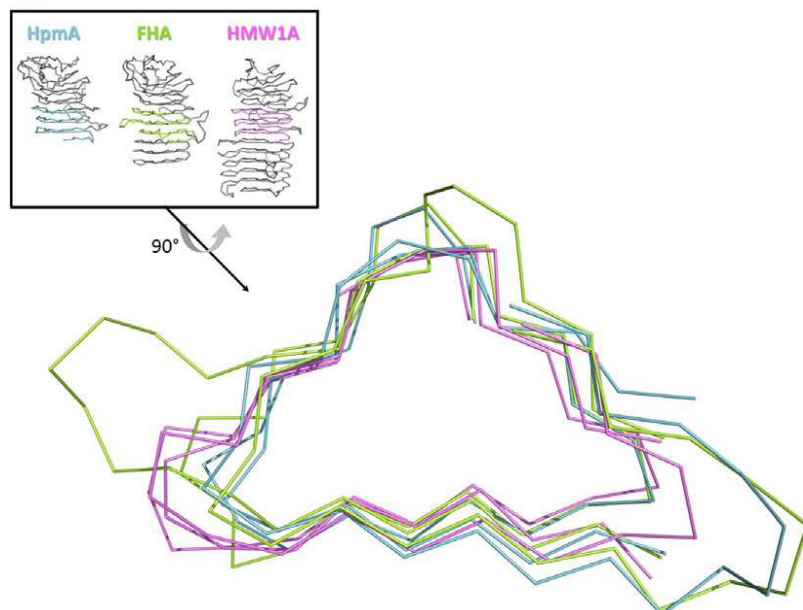
A**B**

Fig 5

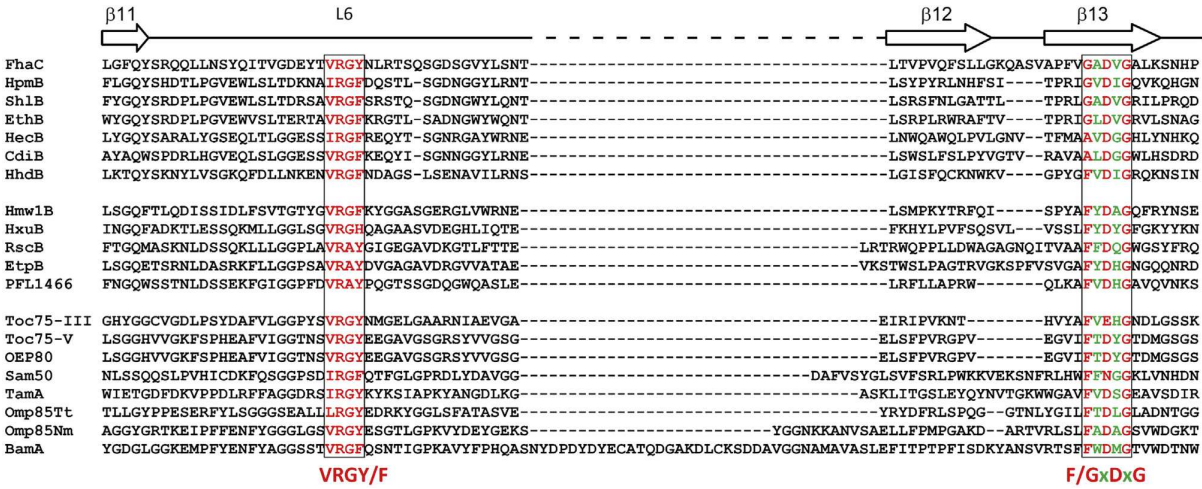
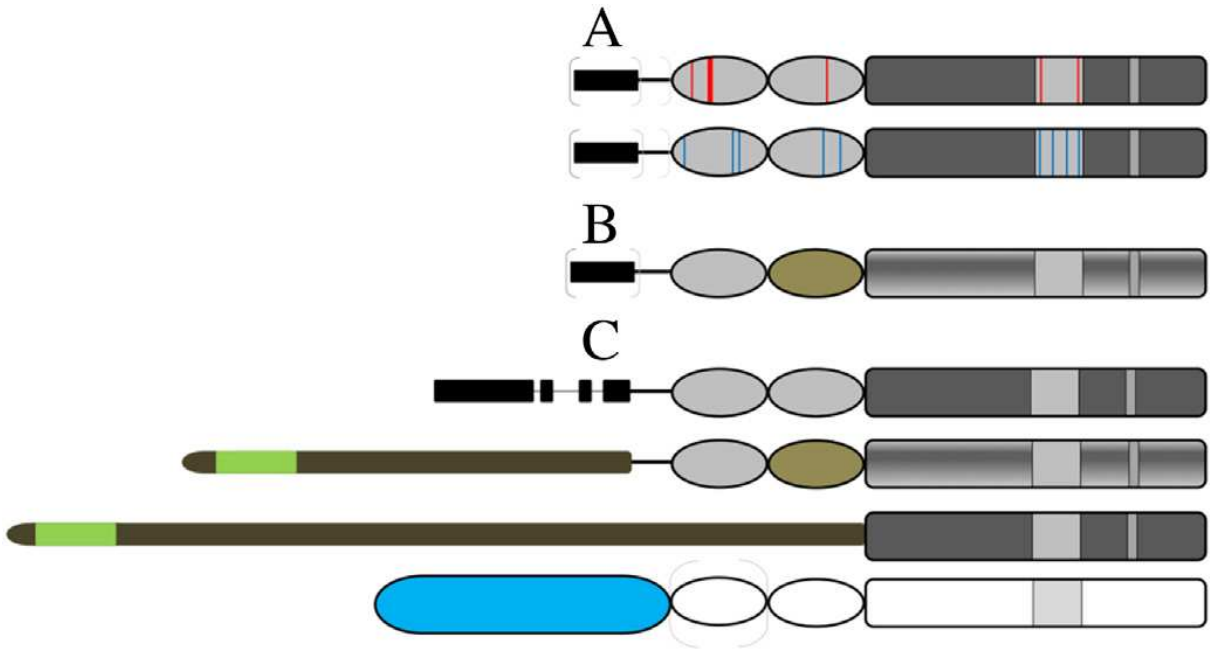


Fig 6



Translocation path of substrate protein through Omp85 transporter

Catherine Baud^{1,2,3,4}, Jérémy Guérin^{1,2,3,4}, Emmanuelle Petit^{1,2,3,4},

Elodie Lesne^{1,2,3,4}, Elian Dupré^{1,2,3,4}, Camille Locht^{1,2,3,4}, Françoise Jacob-Dubuisson^{1,2,3,4*}

¹ Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille, 1 rue Calmette, 59021
Lille cedex, France

² CNRS UMR8204, Lille, France;

³ INSERM U1019, Lille, France;

⁴ Univ Lille Nord de France, 59019 Lille, France.

* for correspondence; tel +33 320 87 11 55; fax +33 320 87 11 58; e-mail
francoise.jacob@ibl.cnrs.fr

Running title: protein translocation path across the outer membrane

Abstract

TpsB proteins are Omp85 superfamily members that mediate protein translocation across the outer membrane of Gram-negative bacteria. Omp85 transporters are composed of N-terminal POTRA domains and a C-terminal transmembrane β barrel. In this work we track the *in vivo* secretion path of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin FHA, the substrate of the model TpsB transporter FhaC, using site-specific cross-linking. The conserved secretion domain of FHA interacts with the POTRA domains, specific extracellular loops and strands of FhaC and the inner β -barrel surface, demonstrating that the Omp85 barrel serves as a channel for translocation of its substrate protein. The interaction map indicates a funnel-like pathway, with conformationally flexible FHA entering the channel in a non-exclusive manner and exiting along a 4-stranded β sheet at the surface of the FhaC barrel. This sheet of FhaC guides the secretion domain of FHA along discrete steps of translocation and folding.

INTRODUCTION

The widespread ‘two-partner secretion’ (TPS) pathway mediates the translocation of large proteins, involved in adherence, cytolysis, iron acquisition or growth inhibition, across the outer membrane of both pathogenic and non-pathogenic Gram-negative bacteria ¹. TPS systems are composed of two proteins, collectively called ‘TpsA’ for the secretory proteins and ‘TpsB’ for their transporters ². The secreted TpsA proteins share a conserved, 250-residue-long N-terminal ‘TPS’ domain essential for secretion and a β -helix fold ³⁻⁷. TpsB transporters are integral outer membrane proteins of the Omp85 superfamily, which is found in all branches of the phylogenetic tree ⁸. Omp85 transporters mediate the translocation of their protein substrate(s) across, or their assembly into, specific cellular membranes. They share a common architecture that consists of a transmembrane β -barrel domain preceded by one or several POTRA domain(s) located in the inter-membrane space ⁹⁻¹². The POTRA domains appear to mediate protein-protein interactions ¹³⁻¹⁶. However, the molecular mechanisms of protein transport or integration and in particular the role of the β barrel remain poorly understood ^{11,12,17-21}.

The filamentous hemagglutinin (FHA)/FhaC system of the whooping cough agent, *Bordetella pertussis*, is a model for the TPS pathway. The TpsA protein FHA, a major adhesin of *B. pertussis* ²², is translocated to the bacterial surface by its TpsB partner, FhaC. The crystal structures of Fha30, a 30-kDa secretion-competent N-terminal FHA truncated fragment, and of FhaC have been determined ^{4,9}. Fha30 comprises the entire TPS domain of FHA, which forms a right-handed parallel β helix flanked by conserved anti-parallel β -structure elements, and a few additional β -helix coils after the TPS domain ⁴ (Fig. 1a). FhaC is composed of two periplasmic POTRA domains in tandem followed by a 16-stranded transmembrane β barrel ⁹ (Fig. 1b). The pore of the barrel is obstructed by the N-terminal α helix H1 and the

extracellular loop L6 of FhaC. H1 is joined to the barrel-distal POTRA1 domain by a 25-residue long periplasmic linker. We have recently shown that H1 is mobile within the pore and can move to the periplasm²³. The extracellular loop L6, which folds back into the pore, harbors a conserved sequence motif characteristic of the Omp85 superfamily and is essential for function^{9,24-26}. According to the current secretion model, FhaB, the FHA precursor, is exported across the cytoplasmic membrane by the Sec machinery and chaperoned by DegP in the periplasm²⁷⁻²⁹. The POTRA domains of FhaC recognize the TPS domain of FHA in an extended conformation, leading to the translocation of the secretory polypeptide across the outer membrane^{14,30,31}. Whether FHA transport occurs through the pore of the FhaC β barrel has not been shown. Upon secretion, FHA folds progressively into a long β helix at the cell surface before undergoing a proteolytic maturation that partially releases it into the milieu³².

In this work we tracked the translocation path of FHA across the outer membrane by performing *in vivo*, cysteine-directed cross-linking. We found that the β barrel of FhaC serves as the protein-conducting channel. An extracellular β sheet of FhaC is crucial for function, and translocation of the TPS domain proceeds by discrete steps.

RESULTS

Mapping of FhaC regions that interact with FHA during translocation

To map the regions of FhaC that are in contact with FHA during secretion, we looked for a model substrate that crosses the outer membrane in an FhaC-dependent manner and folds independently of the rest of FHA^{4,30}, that is produced at good levels in *Escherichia coli*, and that interacts long enough with FhaC for detectable inter-protein cross-linking to occur. Although Fha30, a secretion-competent, N-terminal truncated fragment of FHA, met the first

conditions ⁴, initial experiments with non-specific cross-linkers indicated that it was secreted much too fast. Thus, to freeze the interactions between the two partners, we used the Fha30-BugE chimera ²³. When co-produced with FhaC in *E. coli* this chimera stalls across the outer membrane, with its Fha30 moiety exposed to the cell surface and the globular BugE moiety in the periplasm. We have shown that such chimeras mimic translocation intermediates and can thus be used as tools to probe the on-going secretion process ²³.

Single Cys residues were introduced at more than 50 positions in FhaC by site-directed mutagenesis (Fig. 2a). The substitutions did not affect the production of FhaC, its location in the outer membrane or its ability to secrete Fha30 (not shown). We co-produced Fha30-BugE with each FhaC_{Cys} variant in *E. coli*. In this system, the expression of FhaC is under the control of a weak constitutive promoter, while that of the chimera is induced with IPTG for a short period of time at the exponential growth phase of the culture, so that the chimera is presented to preformed FhaC in the outer membrane. The bacteria were treated with the heterofunctional sulfhydryl-to-amine cross-linkers SPDP, LC-SPDP or SMCC, and following disruption of the bacterial membranes, FhaC or FhaC-containing complexes were isolated by taking advantage of the property of FhaC to bind to Ni⁺⁺ beads irrespective of a 6-His tag. The material eluted from the beads was analyzed by immunoblotting using anti-Fha30 and anti-FhaC antibodies (Fig. 2b; Supplementary Figure S1). Complexes between the two proteins were detected for FhaC derivatives harboring Cys residues in the POTRA domains, a periplasmic loop, the barrel interior (B9-B11), the extracellular portions of β strands B5, B7 and B8 and the extracellular loops L3, L4 and L5, but not in H1, the linker, other extracellular loops, or in a lipid-facing position of the β barrel (Cys468). Low amounts of cross-linked species were also found for some FhaC variants with Cys residues in the conserved L6 loop.

Thus, three regions of FhaC principally interact with the stalled Fha30-BugE chimera: the surface of the POTRA domains oriented towards the β barrel, the inner wall of the barrel, and specific extracellular loops and strands. Detection of cross-links between the chimera and inward-facing residues of the FhaC β -barrel strands B9-11 located halfway into the pore (Fig. 2) provides the first direct evidence that the TpsA protein crosses the outer membrane through the proteinaceous channel formed by its TpsB partner. In addition, most FhaC-chimera cross-links involving extracellular portions of FhaC are localized in an extracellular β sheet formed by the longest β -barrel strands (B5 to B8), and in nearby surface loops L3, L4 and L5. As for the interactions of the POTRA domains with the chimera, they involve the same regions of the POTRA domains as those identified to interact with Fha30 *in vitro* ¹⁴. The topology of the chimera suggests that BugE, rather than Fha30, is in contact with the POTRA domains in these stalled complexes.

To confirm the pathway observed with Fha30-BugE and to ascertain that it was not affected by the presence of the BugE cargo, we performed a limited number of cross-linking experiments with another model substrate harboring a different cargo, Fha30-calmo. Of note, we have shown that this chimera could be released into the milieu from the stalled complex after unfolding its calmodulin cargo ²³. The Fha30-calmo chimera was found to cross-link with FhaC in a similar manner as the Fha30-BugE model substrate, although the amounts of complex were weaker (Supplementary Fig. S2).

Regions of FHA that interact with FhaC

To identify regions of the TPS domain that are close to FhaC in the course of translocation we introduced Cys residues at various positions of the Fha30 moiety of the Fha30-BugE chimera (Fig. 3a, Supplementary Table S1 for the list of positions tested). In addition to a few β -helix

positions, we particularly targeted segments that form extra- β -helix elements conserved in the TpsA family ⁴⁻⁶. Most substitutions did not affect the secretion of Fha30 alone, enabling us to use the corresponding chimeras for cross-linking, while those that abolished secretion or caused intracellular proteolytic degradation of the chimera were discarded (Supplementary Table S1). *In vivo* cross-linking experiments showed that Cys residues in two major discrete regions of the TPS domain mediated the formation of complexes between the chimera and FhaC: the N-terminal region up to b8, and the region encompassing residues 176-200 in the second part of the TPS domain, i.e. in the less conserved 'LC2' region ⁴ (Fig. 3b).

Tracking the FHA path in FhaC

Next, we combined single Cys variants of FhaC with those of Fha30-BugE and looked for spontaneous formation of inter-protein disulfide (S-S) bonds in the course of translocation, in order to obtain a site-specific interaction map. N-ethyl maleimide was added before cell lysis to avoid extraneous bonds. A number of specific FhaC-chimera complexes were detected (Table 1, Fig. 4). Positions up to b16-b17 in Fha30 formed S-S bonds with the POTRA domains of FhaC, as well as with the linker. In addition, several regions of FHA including the b7, b8, b24 and b25 strands formed S-S bonds with the barrel interior. Finally, the N-terminal cap (b1-b3) and a central region of the TPS domain (residues 191-221) both formed cross-links with the extracellular sheet of FhaC (Fig. 4). Altogether, there was a good agreement between the chemical cross-links and the spontaneous S-S bonds.

In many cases, a given Cys in Fha30 was involved in S-S bonds with several Cys residues located in non-contiguous regions of FhaC (Table 1), indicating sequential or alternative interactions of the secretory polypeptide with its transporter. In particular, each of the three N-proximal Cys of Fha30 cross-linked with the POTRA domains, the inner barrel surface, the

extracellular β strands B5-B8 and the L5 loop. These interactions thus track possible paths of the Fha30 N terminus through FhaC.

The observation that some Fha30 Cys residues (e.g., Cys8 or Cys190-191) formed S-S bonds with opposite sites in the first half of the barrel (Cys269 in B4 and Cys372 in B9) indicates that the chimera does not enter the FhaC channel along a strictly defined path. Instead, it appears to interact by more than one manner with the entrance of the FhaC channel. In contrast, interactions at the exit of the channel involved principally one side of the barrel, with intense S-S bonded complexes involving B5-B8 (Cys290, 337, 347) and L5 (Cys391) of FhaC, and N-terminal (Cys8 and Cys25) and central (residues 190-221) regions of Fha30. Interestingly, these two regions harbor non- β -helix, anti-parallel structural elements in the native TPS domain, including the b1-b3 cap of the β helix and the b24-b25 β hairpin (Fig. 1a).

Identification of putative translocation intermediates

Two regions that are not spatially close to each other in Fha30 -i.e., the N-terminal region and a central region of the TPS domain- both interact with the extracellular B5-B8 β sheet of FhaC. Therefore, we hypothesized that these interactions reflect sequential intermediates of translocation captured by cross-linking because they correspond to translocation pauses. This was tested by treating bacteria that co-produce Fha30-BugE and FhaC with Proteinase K without any cross-linking. This was done on intact or outer-membrane permeabilized bacteria. BugE in the chimera was tagged with a C-terminal myc epitope for detection (Fig. 5). Cell samples were TCA-precipitated, and the chimera fragments were detected by immunoblotting with anti-Fha30 or anti-myc antibodies.

Treatment of intact cells yielded species of approx. 60, 50 and 45 kDa that reacted with both antibodies (denoted I-IV), and shorter species around 22-23 kDa (V and VI) detected only

with anti-Fha30 antibodies (Fig. 5a,c). In permeabilized cells, bands I and II disappeared, and species slightly smaller than III and IV were only detected with the anti-myc antibodies (Fig. 5b,c). This indicated that BugE was resistant to proteolysis, while Fha30 portions in species I and II were protected from degradation by the outer membrane in intact cells but mostly degraded after permeabilization. Species V and VI most likely encompass surface-exposed Fha30 fragments fairly resistant to protease treatment.

The low-abundance species detected by immunoblotting could not be identified by mass fingerprinting analyses from total cell lysates. To confirm the identity of species V and VI, we treated purified Fha30 with proteinase K and analyzed the polypeptides by mass fingerprinting (Supplementary Fig. S3). The major proteolytic product of native Fha30 that most likely corresponds to species V or VI encompasses the N-terminal two-thirds of Fha30.

Altogether, thus, the presence of species I-IV confirms the occurrence of intermediates of translocation, consistent with the idea that secretion proceeds by steps.

Role of extracellular β sheet of FhaC

Finally, to probe the importance of the extracellular B5-B8 β sheet for FhaC secretion activity, we deleted the L3 and L4 loops and shortened the extracellular portions of the B5-B8 β strands. The FhaC variants were detected in normal amounts in the cells, but secretion was affected or abolished by these deletions, unlike for the L1 or L2 deletion variants used as controls (Fig. 6a). Consistent with this secretion defect, low amounts of cell-associated Fha30-BugE were found, indicating significant intracellular degradation of the chimera. Integrity of the extracellular B5-B8 sheet and of the L3 and L4 loops is thus important for FhaC function.

Flow cytometry analyses were performed on cells co-producing Fha30-BugE that harbors an N-terminal myc tag and the FhaC variants (Fig. 6b). The bacteria were treated with an anti-

myc FITC conjugate for detection of the chimera at the surface. Cells that produced the FhaC variants with the longer deletions showed no labeling at all, indicating that they could not translocate the chimera, consistent with its intracellular degradation. The other bacteria were labeled by the antibody at lower levels than controls (Fig. 6b). Alterations of the B5-B8 β sheet thus prevent the chimera from engaging properly into the channel and/or from stably reaching the cell surface, which strongly compromises secretion. Thus, the extracellular β sheet of FhaC is a critical determinant for activity.

DISCUSSION

In this work we used the model FHA/FhaC TPS system to define the pathway of the secreted TpsA protein across its outer membrane transporter TpsB. By freezing the interactions between the partners we characterized them during translocation and provide here the first evidence of an Omp85 substrate using the β barrel of its transporter as a channel. Spontaneous S-S bond formation between the two proteins in the course of secretion also provided a dynamic view with snapshots of the transport process. We uncovered the critical role of an extracellular β sheet for FhaC secretion activity. Interestingly, corresponding surface regions of the *E. coli* Omp85 transporter BamA were also found to be essential for function^{33,34}.

In the crystal structure, the FhaC channel is mostly obstructed by the N-terminal α helix H1⁹. Our findings that FHA threads its way through the FhaC pore is consistent with our findings that H1 plugs the resting barrel and moves to the periplasm for FHA translocation²³. L6 is also located in the β -barrel pore of Omp85 transporters^{9,11,12}. Unlike H1, however, we do not know whether it fully moves out of the FhaC pore in the course of secretion. The drastic effects of deletions, amino acid substitutions and the observation of conformational changes have suggested that L6 participates in the transport mechanism of Omp85 proteins^{11,21,26,35,36}.

Our findings that L6 of FhaC weakly interacts with the substrate in the course of translocation argue against its playing a direct role to pull the secretory polypeptide towards the surface. How it contributes to activity remains a major unanswered question for Omp85 transporters.

The 4-stranded B5-B8 surface β sheet of FhaC strongly interacts with FHA in the course of translocation. Its structural integrity is critical for FhaC function, as shown by the drastic effects of deletions. In support with this, we showed earlier that insertions in B5, B6 and L4 inactivated FhaC^{35,37}. Notably, B5 to B8 are generally long, and B9 is short in TpsB proteins (Supplementary Fig. S4). In addition, the available Omp85 structures show that the B5-B8 β sheet is a conserved structural feature of the β barrel^{9,11,12,34}. These observations support a specific role for this sheet in the transport mechanism. In FhaC, B5-B8 appears to serve as a guide to which specific portions of the TPS domain bind in the course of translocation. This binding might involve β augmentation of the edge strand of the FhaC β sheet. In BamA, the extracellular loops L3 and L4 that join B5 to B6 and B7 to B8 form a dome over the barrel together with two other surface loops, thus limiting the opening of the channel to the milieu^{11,34}. In the *E. coli* BamA, L3 also delineates with other loops a hydrophilic surface cavity proposed to facilitate the transport of soluble loops or domains of the substrate proteins³⁴. Thus, the distinct conformations of these extracellular regions in FhaC and BamA are in good agreement with the respective functions of the two types of transporters.

The preferential cross-links of two non-contiguous regions of the TPS domain to the extracellular β sheet and loops, and the occurrence of protected species comprising large portions of Fha30 in the proteolysis experiments both support the hypothesis of discrete translocation intermediates. *In vitro* translocation experiments have also suggested the existence of intermediates³¹. We thus propose that translocation of the TPS domain proceeds by steps of binding, pause and release. The TPS regions that bind strongly to the extracellular

sheet in these putative translocation intermediates mainly form extra- β -helix, anti-parallel β structures in the native TPS domain. Their binding to the FhaC extracellular sheet is thus compatible with the progressive folding of β -helical segments at the surface.

The Cys-Cys bonds approach provided a dynamic picture of the FhaC-Fha30 interactions and indicated a funnel-like route for the FHA polypeptide through its transporter. Several cross-links of a given Fha30 residue with spatially distant residues of FhaC in the POTRA domains and at the barrel entrance indicate more than one possible path(s) as FHA initiates translocation. A major site for POTRA domains-TPS domain interactions is a hydrophobic groove formed by the edge strand of the β sheet of the POTRA2 domain and its flanking α helix, which could accommodate extended, amphipathic segments of the substrate ¹⁴. The highly repetitive, amphipathic structure of the TPS domain ^{4,38} makes it likely that its initial positioning along the POTRA domains is not univocal, and these initial interactions might then determine the entry path of FHA into the channel. As the TPS domain moves through the pore and starts to fold at the surface, it becomes more constrained, and its pathway becomes more defined, as shown by the contacts between the two proteins at the extracellular side of the pore involving exclusively one face of the barrel.

We thus propose the following model for the mechanism of secretion. In the absence of its substrate, FhaC transitions from a closed conformation with H1 inside the pore to an open conformation with H1 in the periplasm ²³. The binding of extended amphipathic FHA segments to the POTRA domains of FhaC stabilizes that open conformation and enables the N terminus of FHA to enter and thread its way into the pore. At the exit, specific anti-parallel β hairpins of the TPS domain of FHA bind to the extracellular β sheet of FhaC, transiently anchoring the polypeptide at the cell surface and facilitating its folding. Once a sufficient portion of the β helix is stably formed, backsliding can no longer occur and the rest of the

FHA polypeptide progressively emerges and prolongs the β helix in the extracellular milieu. This scenario is likely to apply to other TPS systems given the good conservation of critical features in both the transporters and the secreted proteins.

In the Omp85 superfamily, some members mediate the translocation of their protein substrate across the membrane while others mediate protein insertion into a membrane. However, this distinction is more blurred than generally assumed, and some Omp85 transporters may combine both functions. This is probably the case for TamA and BamA when they secrete autotransporters, which harbor both a trans-membrane β -barrel domain and a soluble, extracellular passenger domain^{39,40,41,42}. Thus, we believe that some features of the transport process uncovered in this work will apply to the other superfamily members. In particular and most importantly, we propose that the direct role for the β barrel evidenced in this work applies to all Omp85 transporters. This model indeed concurs with mechanisms proposed for BamA and TamA based on recent X-ray structures^{11,12,34}. Those studies have hypothesized a lateral opening of the Omp85 β barrel to enable the transfer of the substrate into the lipid bilayer. A lateral opening implies that the soluble, surface loop regions of the substrate proteins transit through the barrel while the transmembrane segments are integrated in the bilayer, as discussed in³⁴. Those authors have even proposed that the extracellular dome of BamA might function as a lid that restrains misrouting of the substrate membrane strands that might otherwise be secreted³⁴. Indeed, the β strands of these β -barrel substrate proteins are amphipathic, similar to the β -helix-forming segments of TpsA proteins. Unlike the BamA proteins, TamA has no extracellular dome. It has been proposed that the passenger domain of its substrate translocates through an enlarged barrel combining those of TamA and the autotransporter, after which the composite barrel splits to release the autotransporter's barrel into the membrane¹². The fact that two features of the barrel, L6 and a specific sequence

motif in the β -barrel strand B13 are conserved and essential for function ^{10,11,25,26} corroborates the essential role of the β barrel in the transport process for the entire superfamily.

METHODS

Plasmids

pFc3 is the expression plasmid for FhaC ³⁵. It was modified by site-directed mutagenesis to introduce Cys codons at specific positions using the QuikChange II XL kit (Agilent technology). All mutated fragments were fully verified by sequencing. Deletions were introduced by generating *EcoRI-BamHI* and *BglII-HindIII* PCR fragments that encompass the 5' and 3' portions of *fhaC* and ligating them together in *EcoRI-HindIII* restricted pFc3. Cys codons were introduced into *fha30* by site-directed mutagenesis on a modified version of pEC138b ⁴³, harboring the 3' *NotI-BamHI* portion of *fha30* made as a synthetic gene fragment (GeneCust) without the *PstI* site and with codon optimization. To enhance cross-linking, two consecutive Cys codons were introduced together in several Fha30 variants. The relevant restriction fragments were then exchanged for their parent fragments in pEC141bis, which codes for Fha30-BugE ²³. The final expression plasmids are based on pBBItac ⁴³ harboring the *EcoRI-HindIII* fragments from the corresponding pEC138 and pEC141 variants. pBBItac141b, pBBItac141b-Cmyc and pBBItac-Nmyc for the expression of the Fha30-BugE chimera and its myc-tagged versions were described ²³.

***In vivo* cross-linking**

E. coli UT5600 cells harboring both a pFC3 derivative and a pBBItac141b derivative were grown to an OD₆₀₀ of 0.8 in 25 ml of LB medium with gentamycin (10 µg/mL) and ampicillin (150 µg/mL) and then treated for 2.5 hours with 1 mM IPTG. Cells (4 ml) were harvested by centrifugation, washed once and concentrated 10 times in cross-linking buffer (20 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA). DMSO or 0.2 mM succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP), LC-SPDP (long chain SPDP) or succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1carboxylate (SMCC) (Thermo Scientific) dissolved in DMSO was added, and the samples were incubated for 1 hour at 37°C under rotation. After quenching for 10 min on ice with 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), cells were washed with the cross-linking buffer and lysed by freezing and thawing. The membranes were solubilized in 8 M urea, 1% Triton X100, 20 mM Hepes (pH 7.4) and 150 mM NaCl. Urea concentration was adjusted to 6 M, and the complexes were affinity-purified by incubation with 50 µl of Ni-NTA magnetic beads (Millipore), taking advantage of the natural affinity of FhaC for Ni-NTA. Beads were washed twice in 0.5% Triton X100, 20 mM Hepes (pH 7.4), 150 mM NaCl containing 6 M urea (washing buffer) and then 2 M urea. The complexes were eluted with 400 mM imidazole in washing buffer. They were resolved by electrophoresis using 3-8% Tris acetate gels (Nu-PAGE - InVitrogen) without reducing agent in the sample buffer and analyzed by immunoblotting with polyclonal anti-Fha30 antibodies (dilution 1: 3,000)²³ and HRP-coupled secondary antibodies (dilution 1 : 10,000), and the complexes were detected by chemiluminescence. The same blots were then revealed using anti-FhaC antibodies (dilution 1: 2,500)¹⁴ and alkaline phosphatase-coupled secondary antibodies (dilution 1 : 7,500), followed by colorimetric detection. The same procedure was followed for all cross-linking experiments. The protocol was standardized so that a relative quantification of the complexes

could be performed by densitometry scanning of the corresponding bands on the immunoblots using the Image J software.

Cys-Cys cross-linking

Cultures were performed as above. Samples of 4 ml were harvested by centrifugation, resuspended in 1 ml PBS containing 5 mM N-ethylmaleimide (NEM, Sigma) and incubated for 30 min at room temperature. Cells were then washed in PBS, and membranes were solubilized in 8 M urea, 1% Triton X100, 20 mM Hepes (pH 7.4), 300 mM NaCl, 1 mM NEM. Complexes were purified and analyzed as described above except that all washing and elution steps were performed in 6 M urea, 0.5% Triton X100, 20 mM Hepes (pH 7.4), 300 mM NaCl.

Proteolysis

Cultures were carried out as above, and 0.7-ml aliquots were centrifuged, washed in PBS and resuspended in 0.6 ml of PBS for intact cells, or in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 0.1 mg/ml lysozyme for outer membrane permeabilization. After 20 min of incubation on ice, proteinase K was added to a final concentration of 500 µg/ml and proteolysis was carried out at 37°C. Samples of 100 µl were precipitated with TCA after various times, and the proteins were analyzed using 12% Tris-Glycine gels (Novex - Invitrogen) and immunoblotting with polyclonal anti-Fha30 or monoclonal anti-Myc (Abcam) antibodies. For the mass fingerprinting analyses, native Fha30 was purified as described from culture supernatants ⁴ and used at a concentration of 20 µg/mL. Following proteinase K treatment and electrophoresis, the gel was colored with Coomassie blue (SimplyBlue Safe Stain,

Invitrogen), and the bands of interest were cut and subjected to mass fingerprinting using an Auto Speed TOF/TOF mass spectrometer (Bruker).

Flow cytometry analyses

Cultures were performed as above, and 1-mL aliquots were harvested at 7,000 rpm for 3 min in a tabletop centrifuge. The cells were washed with ice-cold PBS, 3% BSA, 1% sodium azide and resuspended in 400 µl PBS, 3% BSA, 1% sodium azide containing FITC-conjugated anti-Myc tag antibody (dilution 1: 100) (Abcam). After 1 h incubation at room temperature in the dark, cells were pelleted as described above, washed twice in ice-cold PBS with 3% BSA and resuspended in 500 µl of PBS with 3% BSA. Flow cytometry data were acquired on a LSR Fortessa using a photomultiplier (PMT) to increase the FSC signal and analyzed with the FACS Diva Software (Becton Dickinson).

Sequence alignments

TpsB proteins were aligned with the Jalview software ⁴⁴.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Müller and E. Fan for fruitful discussions, H. Drobecq for mass spectrometry analyses, A.S. Delattre, E. Willery and S. Lecher for their help with some experiments, and B. Clantin for comments on the manuscript. J. Guérin acknowledges the receipt of a predoctoral fellowship from the Institut Pasteur de Lille and the Region Nord-Pas de Calais. This work was supported by the grant ANR-10-BLAN-1306 ‘DYN FHAC’ to F. J-D.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.B. and F. J.-D. conceived the project. C.B., J.G., E.P., E.L. and E.D. conducted the experiments. C.B., J.G. and F.J.-D. analyzed data. C.B., J.G., C.L. and F.J.-D. contributed to writing the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interest.

REFERENCES

1. Jacob-Dubuisson, F., Guerin, J., Baelen, S. & Clantin, B. Two-partner secretion: as simple as it sounds? *Res Microbiol* **164**, 583-595 (2013).
2. Jacob-Dubuisson, F., Locht, C. & Antoine, R. Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol Microbiol* **40**, 306-313 (2001).
3. Kajava, A.V. & Steven, A.C. The turn of the screw: variations of the abundant beta-solenoid motif in passenger domains of Type V secretory proteins. *J Struct Biol* **155**, 306-15 (2006).
4. Clantin, B. et al. The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**, 6194-6199 (2004).
5. Yeo, H.J. et al. The structure of the *Haemophilus influenzae* HMW1 pro-piece reveals a structural domain essential for bacterial two-partner secretion. *J Biol Chem* **282**, 31076-84 (2007).
6. Weaver, T.M. et al. Structural and functional studies of truncated hemolysin a from *Proteus mirabilis*. *J Biol Chem* **284**, 22297-22309 (2009).
7. Baelen, S., Dewitte, F., Clantin, B. & Villeret, V. Structure of the secretion domain of HxuA from *Haemophilus influenzae*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **69**, 1322-7 (2013).
8. Gentle, I.E., Burri, L. & Lithgow, T. Molecular architecture and function of the Omp85 family of proteins. *Mol Microbiol* **58**, 1216-25 (2005).
9. Clantin, B. et al. Structure of the membrane protein FhaC: a member of the Omp85-TpsB transporter superfamily. *Science* **317**, 957-61 (2007).
10. Jacob-Dubuisson, F., Villeret, V., Clantin, B., Delattre, A.S. & Saint, N. First structural insights into the TpsB/Omp85 superfamily. *Biol Chem* **390**, 675-84 (2009).
11. Noinaj, N. et al. Structural insight into the biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature* **501**, 385-90 (2013).
12. Gruss, F. et al. The structural basis of autotransporter translocation by TamA. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 1318-1320 (2013).
13. Kim, S. et al. Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. *Science* **317**, 961-4 (2007).
14. Delattre, A.S. et al. Substrate recognition by the POTRA domains of TpsB transporter FhaC. *Mol Microbiol* **81**, 99-112 (2011).

15. Knowles, T.J. et al. Fold and function of polypeptide transport-associated domains responsible for delivering unfolded proteins to membranes. *Mol Microbiol* **68**, 1216-27 (2008).
16. Ricci, D.P., Hagan, C.L., Kahne, D. & Silhavy, T.J. Activation of the *Escherichia coli* beta-barrel assembly machine (Bam) is required for essential components to interact properly with substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 3487-91 (2012).
17. Robert, V. et al. Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif. *PLoS Biol* **4**, e377 (2006).
18. Bos, M.P., Robert, V. & Tommassen, J. Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annu Rev Microbiol* **61**, 191-214 (2007).
19. Stegmeier, J.F. & Andersen, C. Characterization of pores formed by YaeT (Omp85) from *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)* **140**, 275-83 (2006).
20. Knowles, T.J., Scott-Tucker, A., Overduin, M. & Henderson, I.R. Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly. *Nat Rev Microbiol* **7**, 206-14 (2009).
21. Rigel, N.W., Ricci, D.P. & Silhavy, T.J. Conformation-specific labeling of BamA and suppressor analysis suggest a cyclic mechanism for beta-barrel assembly in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 5151-6 (2013).
22. Jacob-Dubuisson, F. & Locht, C. The *Bordetella* adhesins. in *Bordetella molecular microbiology* (ed. Locht, C.) 69-95 (Horizon Bioscience, Norfolk, 2007).
23. Guerin, J. et al. Conformational dynamics of protein transporter FhaC: large-scale motions of plug helix. *Mol Microbiol* **92**, 1164-76 (2014).
24. Moslavac, S. et al. Conserved pore-forming regions in polypeptide-transporting proteins. *FEBS J* **272**, 1367-78 (2005).
25. Delattre, A.S. et al. Functional importance of a conserved sequence motif in FhaC, a prototypic member of the TpsB/Omp85 superfamily. *FEBS J* **277**, 4755-65 (2010).
26. Leonard-Rivera, M. & Misra, R. Conserved Residues of the Putative L6 Loop of *Escherichia coli* BamA Play a Critical Role in the Assembly of beta-Barrel Outer Membrane Proteins, Including That of BamA Itself. *J Bacteriol* **194**, 4662-8 (2012).
27. Chevalier, N. et al. Membrane targeting of a bacterial virulence factor harbouring an extended signal peptide. *J Mol Microbiol Biotechnol* **8**, 7-18 (2004).
28. Baud, C. et al. Membrane-associated DegP in *Bordetella* chaperones a repeat-rich secretory protein. *Mol Microbiol* **80**, 1625-36 (2011).
29. Baud, C. et al. Role of DegP for two-partner secretion in *Bordetella*. *Mol Microbiol* **74**, 315-329 (2009).
30. Hodak, H. et al. Secretion signal of the filamentous haemagglutinin, a model two-partner secretion substrate. *Mol Microbiol* **61**, 368-82 (2006).
31. Fan, E., Fiedler, S., Jacob-Dubuisson, F. & Muller, M. Two-partner secretion of gram-negative bacteria: a single beta-barrel protein enables transport across the outer membrane. *J Biol Chem* **287**, 2591-9 (2012).
32. Coutte, L., Antoine, R., Drobecq, H., Locht, C. & Jacob-Dubuisson, F. Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *EMBO J* **20**, 5040-5048 (2001).
33. Browning, D.F. et al. Mutational and Topological Analysis of the *Escherichia coli* BamA Protein. *PLoS ONE* **8**, e84512 (2013).
34. Ni, D. et al. Structural and functional analysis of the beta-barrel domain of BamA from *Escherichia coli*. *FASEB J* **28**, 2677-2685 (2014).
35. Guédin, S. et al. Novel topological features of FhaC, the outer membrane transporter involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Biol Chem* **275**, 30202-10 (2000).

36. Tellez, R., Jr. & Misra, R. Substitutions in the BamA beta-barrel domain overcome the conditional lethal phenotype of a DeltabamB DeltabamE strain of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **194**, 317-24 (2012).
37. Méli, A.C. et al. Channel properties of TpsB transporter FhaC point to two functional domains with a C-terminal protein-conducting pore. *J Biol Chem* **281**, 158-166 (2006).
38. Kajava, A.V. et al. Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins. *Mol. Microbiol.* **42**, 279-292 (2001).
39. Ieva, R. & Bernstein, H.D. Interaction of an autotransporter passenger domain with BamA during its translocation across the bacterial outer membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 19120-5 (2009).
40. Sauri, A. et al. The Bam (Omp85) complex is involved in secretion of the autotransporter haemoglobin protease. *Microbiology* **155**, 3982-91 (2009).
41. Jain, S. & Goldberg, M.B. Requirement for YaeT in the outer membrane assembly of autotransporter proteins. *J Bacteriol* **189**, 5393-8 (2007).
42. Selkig, J. et al. Discovery of an archetypal protein transport system in bacterial outer membranes. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 506-10, S1 (2012).
43. Alsteens, D., Martinez, N., Jamin, M. & Jacob-Dubuisson, F. Sequential unfolding of Beta helical protein by single-molecule atomic force microscopy. *PLoS ONE* **8**, e73572 (2013).
44. Waterhouse, A.M., Procter J.B., Martin D.M.A., Clamp M. & Barton G.J. Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**, 1189-1191 (2009).

FIGURE

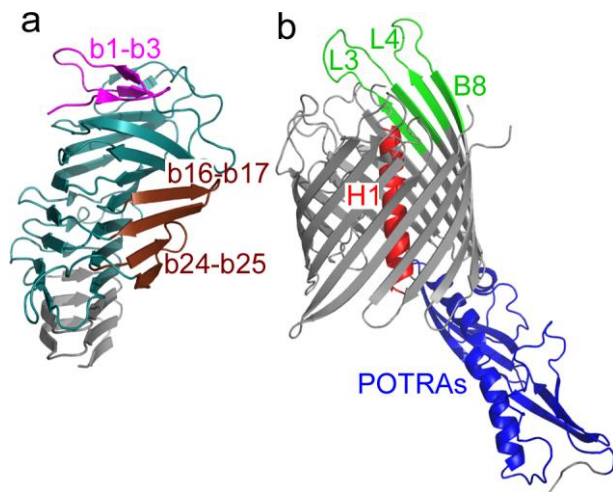


Figure 1. Structures of Fha30 and FhaC. Cartoon representation of Fha30 (pdb: 1rwr, a) and FhaC (pdb: 2qdz, b). In Fha30, the TPS domain is colored while the additional β strands are in gray. The strands that form extra- β -helix elements in the TPS domain have been indicated with small b letters to distinguish them from the FhaC strands (capital B letters) discussed in the text. Note that in the X-ray structure of FhaC the linker and L5 are not resolved. The figures were created with Pymol.

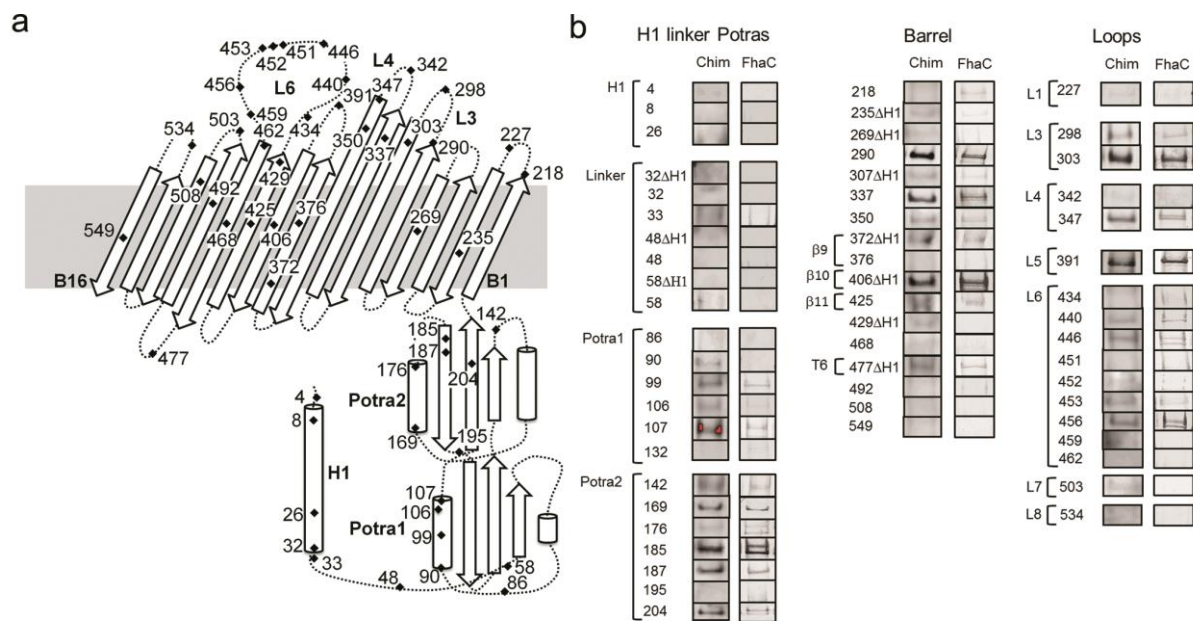


Figure 2. Cross-linking analyses with FhaC Cys variants. (a) Schematic representation of the FhaC topology, with the positions of the Cys residues introduced for cross-linking experiments indicated as black diamonds. The topology is based on a slightly revised version of the FhaC structure (to be published). (b) Immunoblot analyses of the SMCC-cross-linked complexes (or the SPDP-cross-linked complexes for Cys429ΔH1 and Cys372ΔH1) following precipitation of FhaC. The membranes were probed successively with anti-Fha30 antibodies followed by chemiluminescence detection, and with anti-FhaC antibodies followed by alkaline phosphatase detection. Note the presence of two FhaC-containing bands in some cases, the upper one corresponding to the complex and the other to an FhaC dimer that most likely formed upon cell lysis. Some FhaC variants with Cys in the barrel were devoid of H1 to facilitate cross-linker access (denoted ΔH1), since H1 is not essential for activity and moves to the periplasm for FHA translocation^{23,37}. We checked for one such variant (FhaC_{C406}) that similar results were obtained with or without H1 (not shown). In the β barrel we mainly selected residues oriented towards the pore based on the crystal structure of FhaC. Lipid-oriented residue 468 was used as a control.

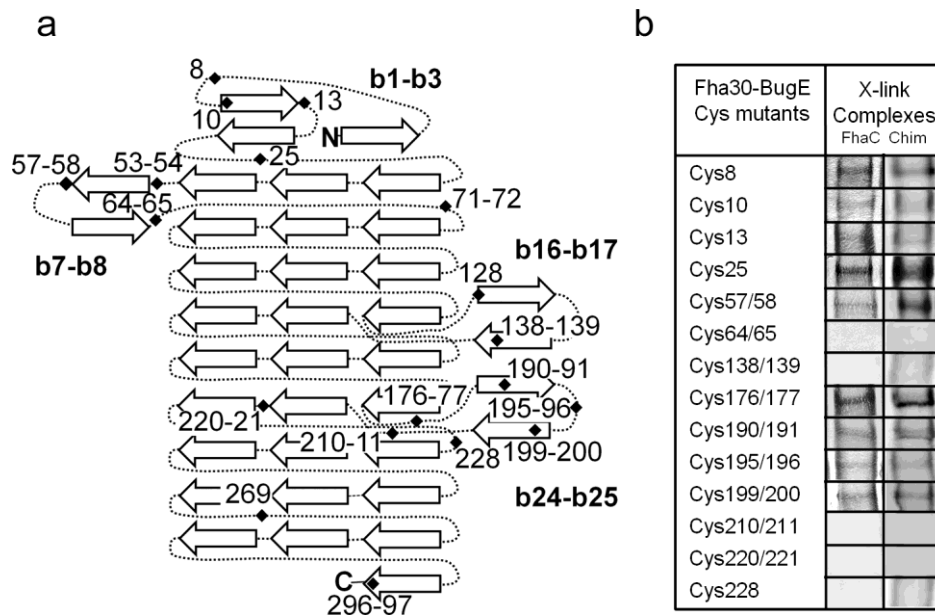


Figure 3. Cross-linking analyses with Fha30-BugE Cys variants. (a) Schematic representation of the Fha30 topology, with the positions of the Cys residues introduced for cross-linking experiments indicated as black diamonds. (b) Immunoblot analyses of the SMCC-cross-linked complexes following precipitation of FhaC. The membranes were probed successively with anti-Fha30 antibodies and with anti-FhaC antibodies as above.

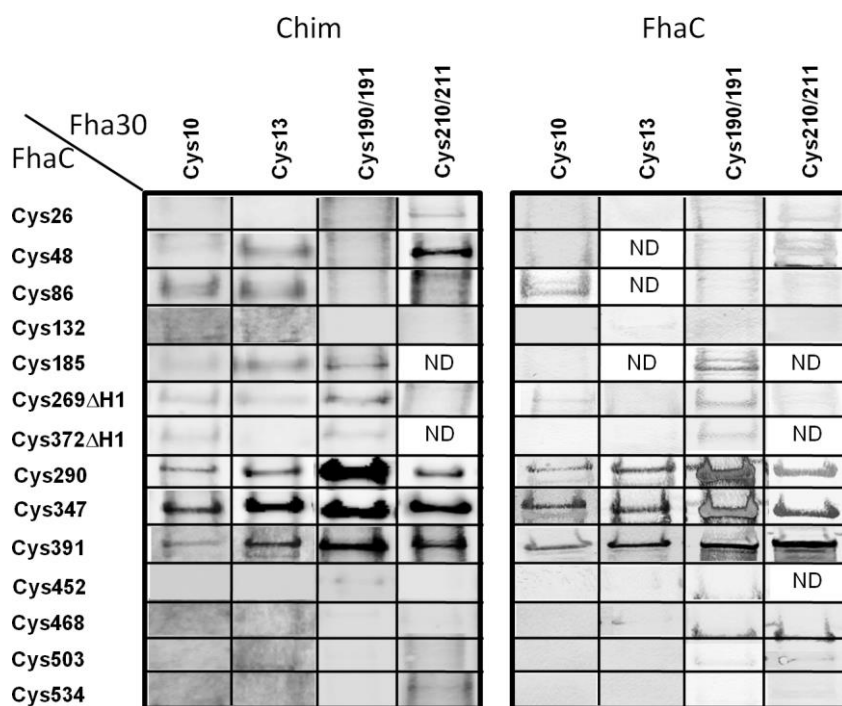


Figure 4. Spontaneous formation of S-S bonds between FhaC and Fha30-BugE. The membranes were successively probed with anti-Fha30 antibodies followed by chemiluminescence detection (left panel), and with anti-FhaC antibodies followed by alkaline phosphatase detection (right panel). The complete set of data is presented in Table 1. ND, not determined.

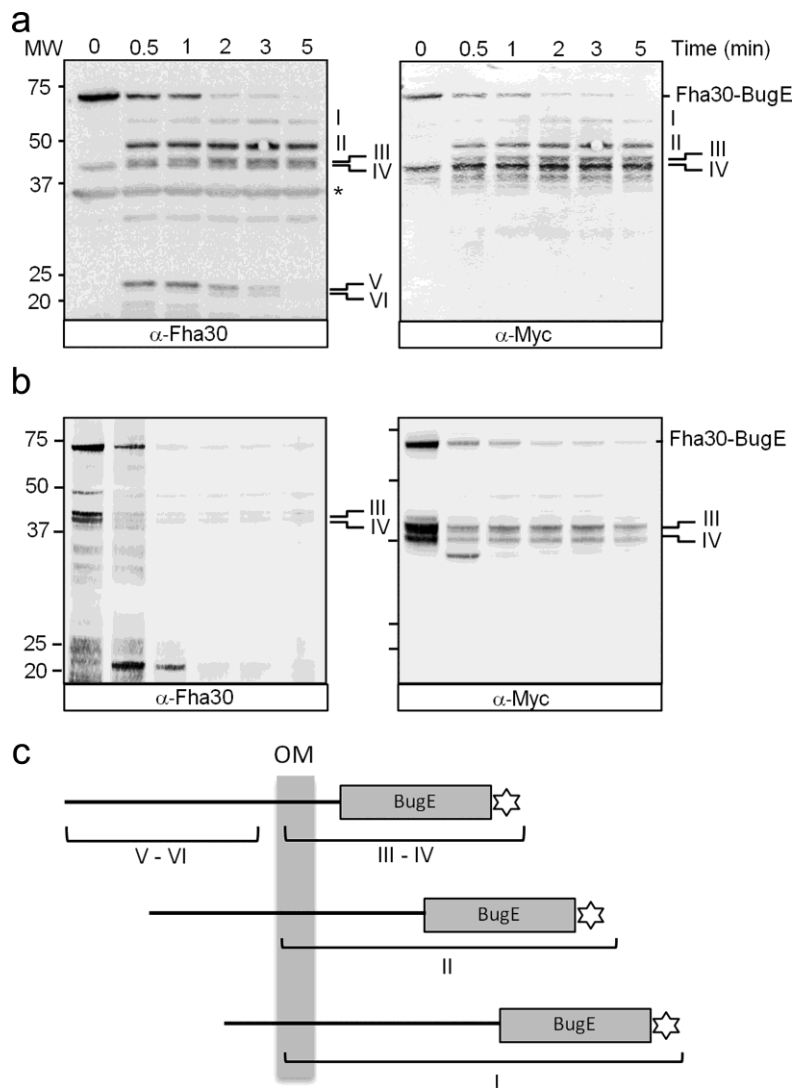


Figure 5. Identification of translocation intermediates by proteolysis. Intact (a) or permeabilized (b) cells co-expressing Fha30-BugE with a C-terminal myc tag and FhaC were treated with proteinase K for the indicated times. Neither protein harbored a Cys residue and no chemical cross-linker was added. After TCA precipitation, total cellular proteins were analyzed by immunoblotting using anti-Fha30 (left panels) or anti-myc (right panels) antibodies. The asterisk indicates a non-specific band. The molecular mass markers are shown at the left (in kDa). A schematic representation of the chimera and its proteolytic fragments is shown in (c). OM and the gray rectangle denote the outer membrane.

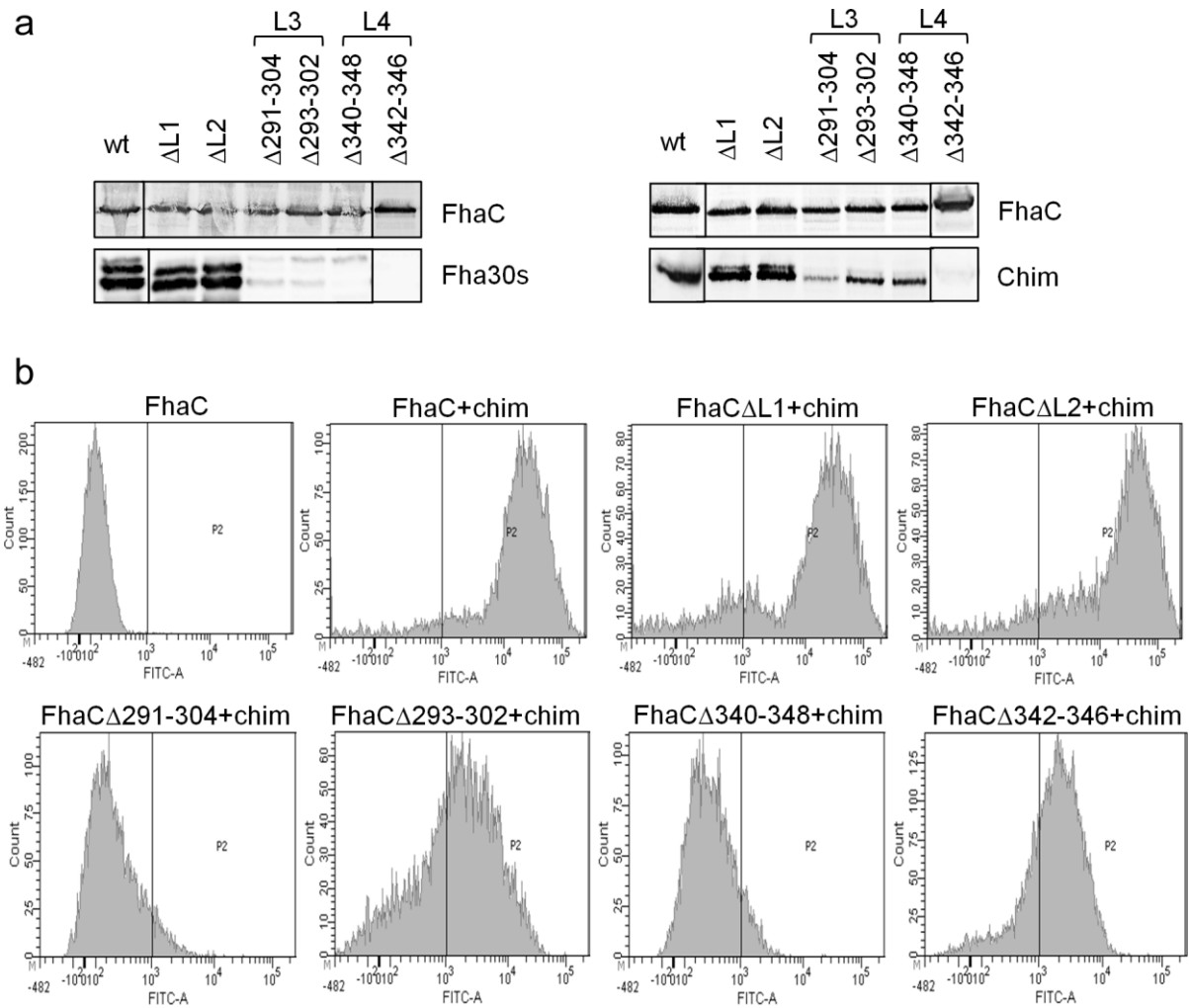





Figure 6. Importance of the extracellular β sheet B5-B8 for FhaC activity. (a) Effects of deletions in the L3 and L4 loops on Fha30 secretion (denoted Fha30s) and on the presence of cell-associated FhaC and Fha30-BugE (denoted chim). Culture supernatants of cells co-producing FhaC and Fha30 (left panel), or lysates of cells co-producing FhaC and Fha30-BugE (right panel) were analyzed by immunoblotting with anti-FhaC and anti-Fha30 antibodies. (b) Flow cytometry analyses of *E. coli* co-expressing Fha30-BugE with an N-terminal myc tag and selected FhaC variants. Exposure of the Fha30 moiety of the chimera at the cell surface was revealed using an anti-myc FITC-conjugated antibody.

TABLES

Table 1. Spontaneous *in vivo* S-S bond formation between FhaC and Fha30-BugE.

Chim FhaC	b1 – b3				b7 – b8		b16 – b17			b24 – b25						
	8	10	13	25	57 58	64 65	128	138 139	176 177	190 191	195 196	199 200	210 211	220 221	228	
H1 8						-			-	-		-	-	-	-	
26									-							
Lk 32									-			-	-	-	-	
48									-							
58									-			-	-	-	-	
P1 86									-							
99								-	-			-	-	-	-	
106						-			-			-	-	-	-	
132	-															
P2 169									-			-	-	-	-	
176	-		-					-	-			-	-	-	-	
185								-	-			-	-	-	-	
187									-			-	-	-	-	
204						-			-			-	-	-	-	
B 218																
235*								-								
269*								-								
372*								-	-			-	-	-	-	
406								-	-			-	-	-	-	
406*								-	-			-	-	-	-	
425*								-	-			-	-	-	-	
468																
477*									-				-	-		
L1 227																
L3 290																
298					-											
303																
L4 337						-										
347																
L5 383																
391																
L6 446																
452																
453																
456																
L7 503																
L8 534																

The positions of the Cys in Fha30-BugE (chim) and in FhaC are indicated. Lk, P1, P2, B and L1-L8 indicate the linker, the POTRA1 and the POTRA2 domains, the β strands and the extracellular loops of FhaC, respectively, while the small b letters indicate the extra- β -helix elements of the TPS domain. The entire procedure of the cross-linking experiment was

standardized so that a relative quantification of the chimeras co-precipitated with FhaC could be performed by densitometry scanning of the corresponding bands on the immunoblots. The data expressed in arbitrary units (au) were pooled in three classes identified as follows:  , no complex formation (< 1,000 au);  , moderate complex formation (1,000-8,000 au);  , strong complex formation (> 8,000 au). The asterisks indicate the FhaC variants in which H1 was deleted. The ‘-’ signs indicate the combinations that were not tested.

Supplementary Tables

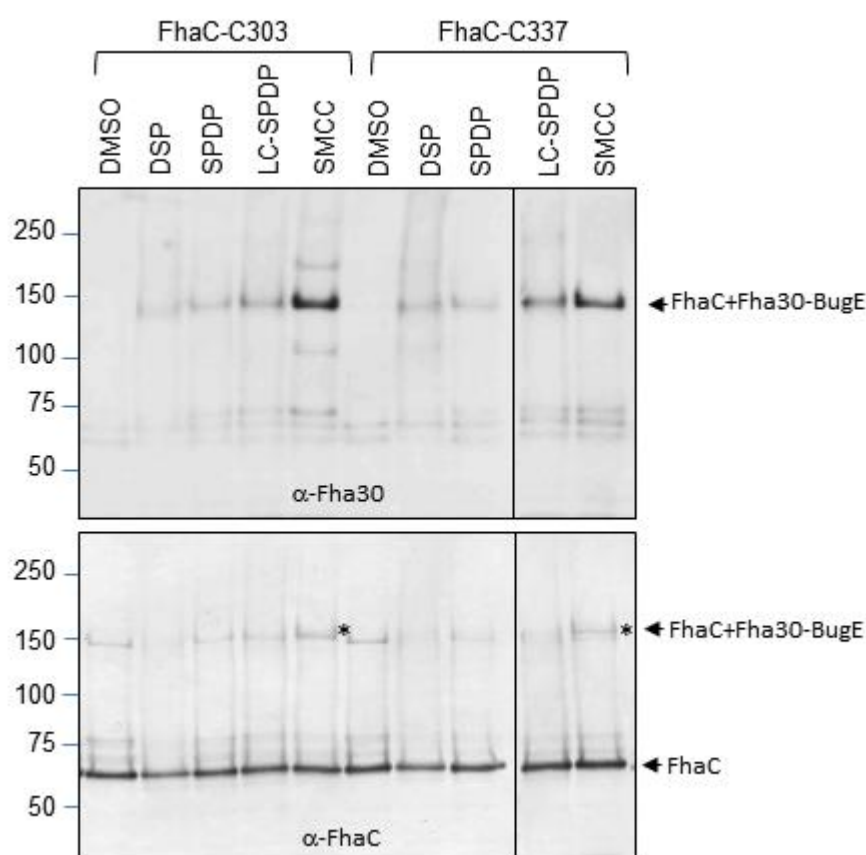
Supplementary Table S1. Relevant features of the Fha30_{Cys}-BugE variants. Cys substitutions were introduced in the Fha30 moiety of the Fha30-BugE chimera for cross-linking analyses with wild type (wt) FhaC. To enhance cross-linking, two consecutive codons were replaced together in most cases. The secretion of the corresponding Fha30 variants was not affected by the substitutions, except for the Cys53/54 and Cys71/72 mutants. Three of the Fha30-BugE variants were undetected by immunoblotting with anti-Fha30 antibodies ('N'), indicating that they were degraded intracellularly, and they were thus not used for the cross linking experiments. Two of the Fha30-BugE variants formed high molecular mass species (HMW) and were also discarded. The remaining fourteen Fha30-BugE variants were used (see Fig. 3).

Cys position in Fha30	Detection of cell-associated Fha30-BugE
wt	Y
Cys8	Y
Cys10	Y
Cys13	Y
Cys25	Y
Cys 53/54	N
Cys 57/58	Y
Cys64/65	Y
Cys 71/72	N
Cys128	HMW
Cys138/139	Y
Cys176/177	Y
Cys190/191	Y
Cys195/196	Y
Cys199/200	Y
Cys210/211	Y
Cys220/221	Y
Cys228	Y
Cys269	N
Cys296/297	HMW

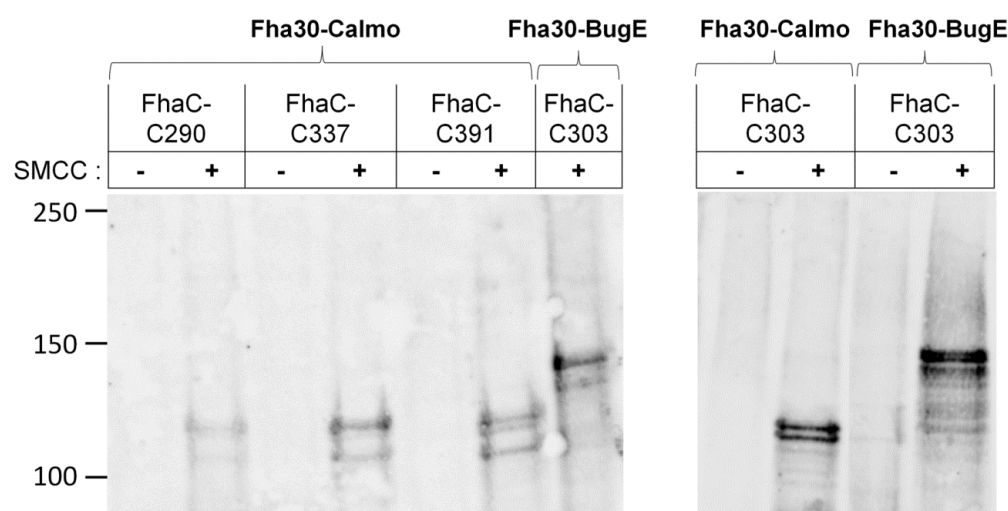
Supplementary figures

Supplementary Figure S1. Representative immunoblots of the cross-linking analyses.

Cells co-expressing Fha30-BugE and FhaC_{Cys303} or FhaC_{Cys337} were treated with the indicated cross-linkers or with DMSO as a control. FhaC and FhaC-containing complexes were precipitated following cell lysis. The precipitated material was analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting by sequentially using anti-Fha30 and FhaC antibodies with different modes of detection (chemiluminescence and colorimetric enzymatic reaction, respectively) on the same blots. A weak band migrating slightly faster than the complex and detected with the anti-FhaC but not the anti-Fha30 antibodies in the DMSO control corresponds to an FhaC dimer that most likely formed upon cell lysis. The asterisks indicate the SMCC-cross-linked complexes. The molecular mass markers are shown at the left (in kDa).

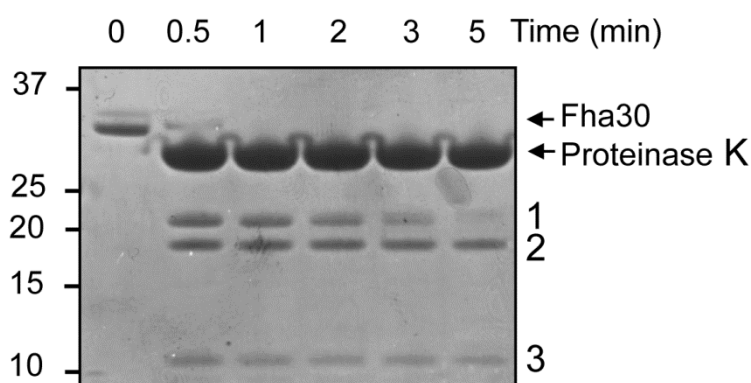


Supplementary Figure S2. Cross-linking analyses with FhaC Cys variants and the Fha30-calmo chimera. Immunoblot analyses of the SMCC-cross-linked complexes following precipitation of FhaC are shown. The FhaC variants selected for these experiments are denoted by the position of their Cys residue, and the FhaC_{cys303}/ Fha30-BugE pair was used as a control. The protocol was the same as that used for chemical cross-linking between FhaC and Fha30-BugE, except that the bacteria were grown in the presence of 200 μ M CaCl₂ to ensure that the calmodulin moiety was folded. The control was treated similarly. A 3-8% polyacrylamide gel was used for the experiments shown in the left panel and a 7% gel for those shown in the right panel. The complexes between FhaC and Fha30-BugE and between FhaC and Fha30-calmo are expected to migrate as 130-kDa and 110-kDa bands, respectively. The blots were probed with the anti-Fha30 antibody and detected by chemiluminescence. Because the Fha30-calmo chimera was produced to a lower level and more susceptible to intracellular proteolysis than Fha30-BugE (see ref. 23), the complex bands are weaker than those obtained with the latter (compare with Fig. 2b). The low amounts of complexes and the poor quality of the anti-FhaC antibodies did not allow to clearly detect FhaC in the complexes even though it was used for precipitation with the Ni⁺⁺ beads, but its presence in the lysates before complex precipitation was verified (not shown). The molecular mass markers are shown at the left (in kDa).



Supplementary Figure S3. Mass fingerprinting analyses of Fha30. (a) Secreted, native Fha30 was purified, and it was digested by proteinase K in the same conditions as in Fig. 5. The molecular mass markers are shown at the left (in kDa). (b) The fragments were analyzed by MALDI-Tof and are positioned on the Fha30 sequence. The peptides corresponding to band 1 are underlined. Band 2 was mostly composed of proteinase K, with also three Fha30 peptides (small letters). For band 3, two C-proximal Fha30 peptides were identified (bold letters).

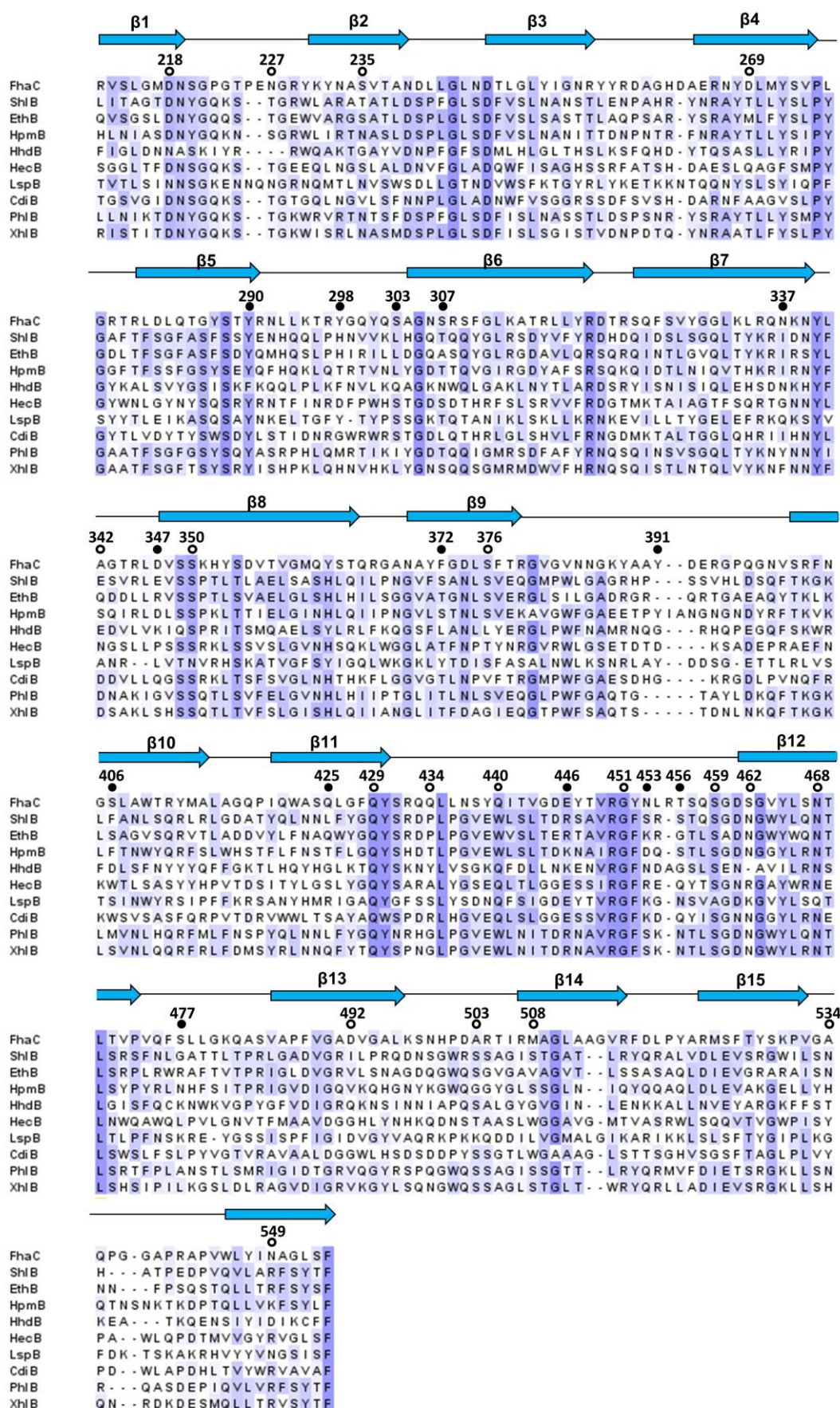
a



b

QGLVPQGQTQVLQGGNKVPVVNIADPNSGGVSHNKfqqfnvanpgvvfnngltdgvsrl
GGALTKNPNLTRQASAILAEVTDTSRSLAGTLEVYGKGADLIANPNGISVNGLSTL
NASNLTLTTGRPSVNGGRigldvqqgtvtier/ggvnatglgyfdvvarLVKLQGAVSSKQ GK
PLADIAVVAGANRYDHATRRATPIAAGARGAAAGAYAIDGTAAGAMYGK**HITLVSSD**
SGLGVR/QLGSLSSPSAITVSSQGEIALGDATVQRGPLSLKGAGVVSAGKLASGGG
AVNVAGGGAV

Supplementary Figure S4. Alignment of FhaC homologs. Only the β -barrel domains are shown. Positions of the β strands are based on the slightly revised FhaC structure (to be published). B5, B6, B7 and B8 that form the extracellular sheet in FhaC are generally long in TpsB proteins, while B9 is short. Thus, B8 is likely to form the edge of an extracellular β sheet in most TpsB transporters. The positions in the FhaC barrel that were tested for chemical cross-linking are indicated. Black dots denote the positions where strong cross-links between FhaC and Fha30-BugE were observed, while white dots denote the positions where the cross-links did not appear or were weak.



Annexe 3

Simulations des spectres RPE

La simulation des spectres issus des expériences de RPE en onde continue a été réalisée à partir de « Easyspin », une boîte à outils qui s'implémente sur l'environnement de développement MatLab® (Stoll and Schweiger, 2006). Comme vu dans l'introduction, une molécule de MTSL correspond à un centre paramagnétique anisotrope décrit par les valeurs des tenseurs g et A . Pour chaque simulation, après avoir défini et fixé la valeur de ces tenseurs, nous avons fait varier la valeur du temps de corrélation (τ_c) jusqu'à ce que le spectre simulé soit superposable au spectre expérimental. C'est la valeur de ce facteur qui rend compte de la mobilité du MTSL à une position donnée de notre protéine (voir Chapitre 3, Introduction). Les spectres présents dans la partie résultat sont souvent définis par l'existence de plusieurs composantes de mobilité (= plusieurs valeurs de temps de corrélation différentes). Pour cela nous avons ajouté un facteur supplémentaire dans nos simulations qui reflète l'importance de chacune de ces composantes sur le spectre totale.

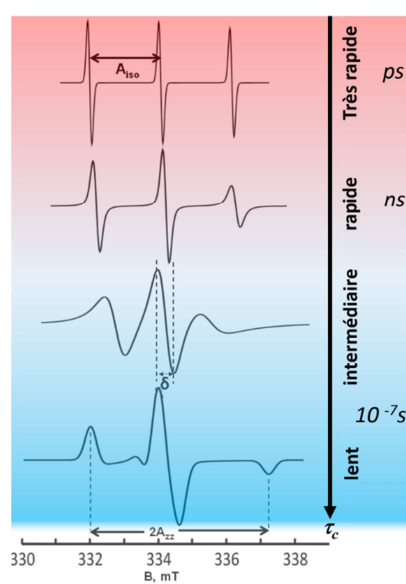
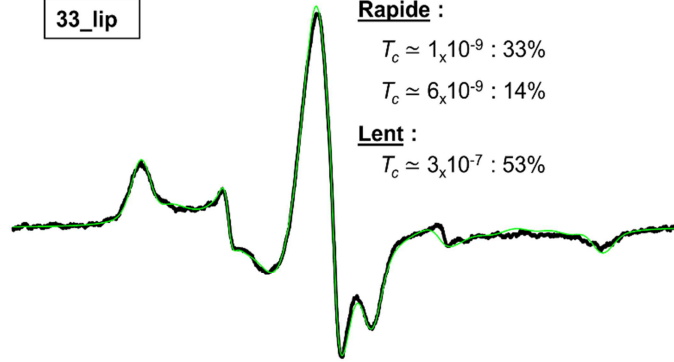


Figure : Evolution d'un spectre RPE d'un radical nitroxyde en fonction de la valeur du temps de corrélation (τ_c). Exprimé en secondes, ce facteur est d'autant plus petit que le mouvement du radical est rapide. On peut ainsi définir des plages de mobilités allant de très rapide ($10^{-12}s$) à lent ($10^{-7}s$).

Ci-dessous, les spectres simulés sont représentés en vert et superposés aux spectres expérimentaux (en noir). Pour chaque, la valeur des temps de corrélations (T_c) et leur importance (en %) sont exprimées. Lors des simulations, pour certains spectres (comme par exemple, 33_lip+substrat ou 33_lip Δ H1, 434), il a été nécessaire d'ajouter des composantes très minoritaires (moins de 2%) avec des temps de corrélation rapides (10^{-10}) pour obtenir une bonne superposition. Par souci de clarté, les poids de ces composantes très minoritaires ne sont pas inscrits, même si ces composantes ont été introduites dans les simulations. Les spectres expérimentaux correspondant à la sonde placée en position 452 dans les variants FhaC D492S, n'ont pas été simulés à cause du mauvais rapport signal/bruit pouvant engendrer des erreurs lors d'une simulation.

33_lip



Rapide :

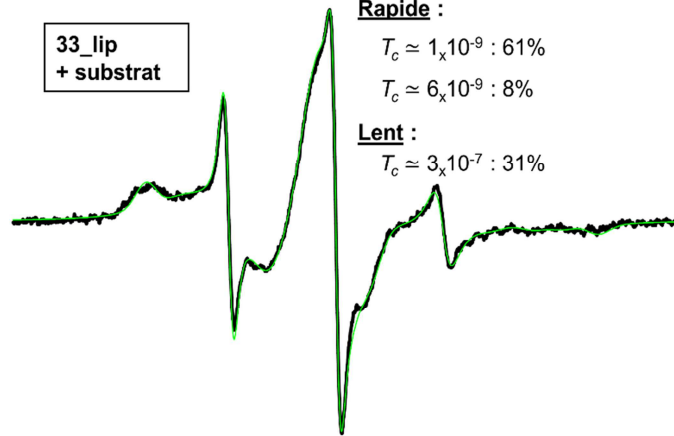
$$T_c \simeq 1 \times 10^{-9} : 33\%$$

$$T_c \simeq 6 \times 10^{-9} : 14\%$$

Lent :

$$T_c \simeq 3 \times 10^{-7} : 53\%$$

33_lip
+ substrat



Rapide :

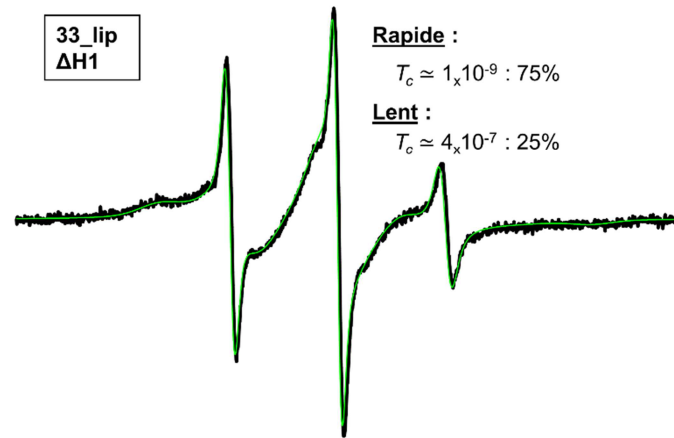
$$T_c \simeq 1 \times 10^{-9} : 61\%$$

$$T_c \simeq 6 \times 10^{-9} : 8\%$$

Lent :

$$T_c \simeq 3 \times 10^{-7} : 31\%$$

33_lip
 $\Delta H1$



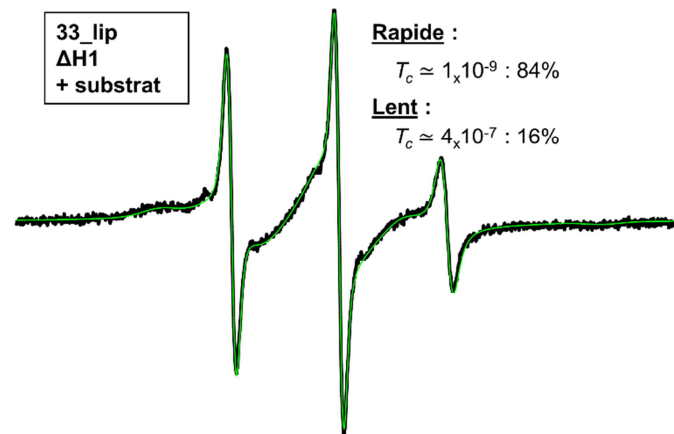
Rapide :

$$T_c \simeq 1 \times 10^{-9} : 75\%$$

Lent :

$$T_c \simeq 4 \times 10^{-7} : 25\%$$

33_lip
 $\Delta H1$
+ substrat



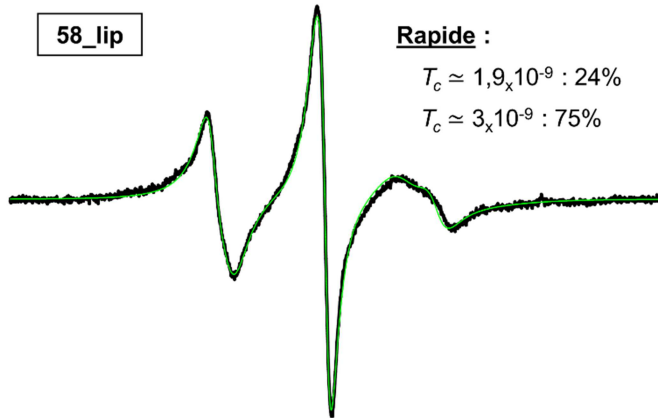
Rapide :

$$T_c \simeq 1 \times 10^{-9} : 84\%$$

Lent :

$$T_c \simeq 4 \times 10^{-7} : 16\%$$

58_lip

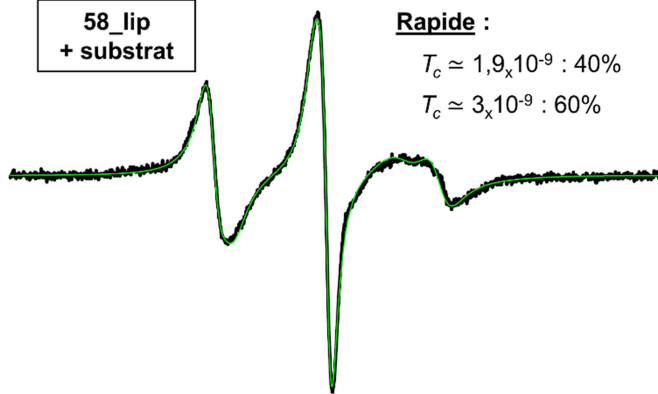


Rapide :

$$T_c \approx 1,9 \times 10^{-9} : 24\%$$

$$T_c \approx 3, \times 10^{-9} : 75\%$$

58_lip
+ substrat

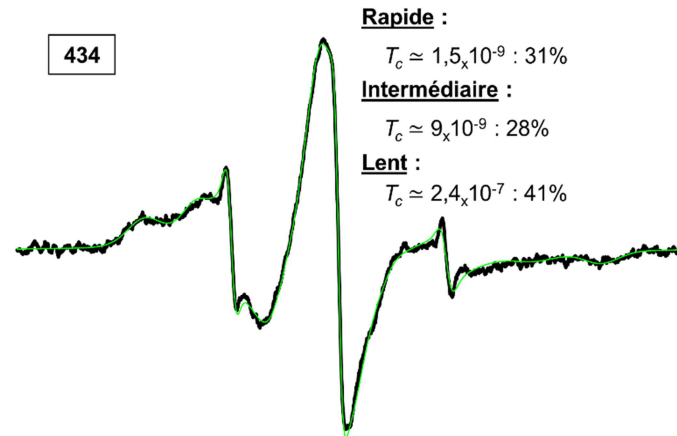


Rapide :

$$T_c \approx 1,9 \times 10^{-9} : 40\%$$

$$T_c \approx 3, \times 10^{-9} : 60\%$$

434



Rapide :

$$T_c \approx 1,5 \times 10^{-9} : 31\%$$

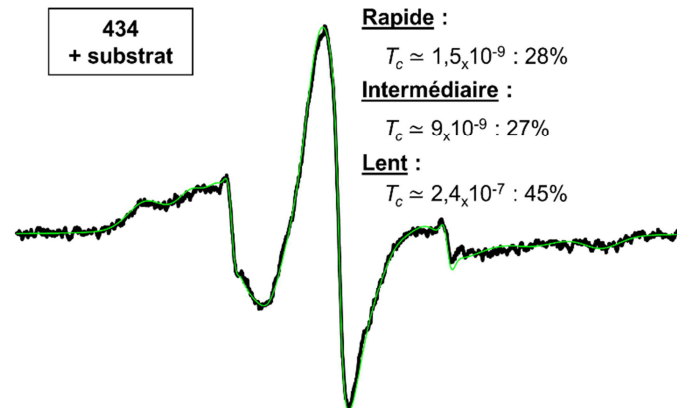
Intermédiaire :

$$T_c \approx 9, \times 10^{-9} : 28\%$$

Lent :

$$T_c \approx 2,4 \times 10^{-7} : 41\%$$

434
+ substrat



Rapide :

$$T_c \approx 1,5 \times 10^{-9} : 28\%$$

Intermédiaire :

$$T_c \approx 9, \times 10^{-9} : 27\%$$

Lent :

$$T_c \approx 2,4 \times 10^{-7} : 45\%$$

